

Zur Kenntnis der Inhaltsstoffe von Lycopus europaeus

Inaugural-Dissertation

zur

Erlangung der Doktorwürde

der

Hohen Naturwissenschaftlichen Fakultät

der

Ludwig-Maximilians-Universität

zu München

vorgelegt

von

Heinz Schilcher

aus

Neuburg/Donau

Mai 1959

Zur Kenntnis der Inhaltsstoffe von Lycopus europaeus

Inaugural-Dissertation

zur

Erlangung der Doktorwürde

der

Hohen Naturwissenschaftlichen Fakultät

der

Ludwig-Maximilians-Universität

zu München

vorgelegt

von

Heinz Schilcher

aus

Neuburg/Donau

Mai 1959



1. Berichterstatter: Professor Dr. L. H ö r h a m m e r
2. Berichterstatter: Professor Dr. E. B a m a n n

Tag der mündlichen Prüfung: 29.7.59

I N H A L T S V E R Z E I C H N I S

Seite

A. E i n l e i t u n g	1
B. A l l g e m e i n e r T e i l	
I. Bisherige Kenntnisse der Inhaltsstoffe von Lycopus europaeus L.	3
II. Voruntersuchungen	4
1. Qualitative Untersuchungen	5
a) Prüfung auf Flavonglykoside	6
b) " " organische Pflanzensäuren	7
c) " " Cumarine	9
d) " " Gerbstoffe	10
e) " " Aminosäuren	11
f) " " Saponine	13
g) " " Alkaloide	14
h) " " Phosphatide und Phosphorsäure- ester	15
i) " " freie Zucker	17
k) " " des unverseifbaren Rückstandes	18
2. Nachweis flüchtiger Stoffe	
a) Mikrowasserdampfdestillation	19
b) Ätherische Öle	19
b') Ursolsäure	22
3. Veraschung und Bestimmung der Kationen und Anionen	
a) Kationen	23
b) Anionen	24
4. Zusammenfassung	25
III. Untersuchung der Glykoside	
1. Isolierung der Flavonglykoside	26

	Seite
2. Ermittlung der Konstitution von Glykosid A (Luteolin-mono-7-glucosid)	29
3. Identifizierung von Glykosid B (Apigenin-mono-7-glucosid)	33
IV. Untersuchung der aromatischen Pflanzensäuren (Oxyzimtsäurederivate)	
1. Zusammenfassende papierchromatographische Untersu- chung von Kaffee-, Chlorogen- und Sinapinsäure	34
Papierchromatographischer Nachweis von Ellagsäure .	38
2. Isolierung von Kaffee- und Chlorogensäure	38
3. Identifizierung von Kaffee- und Chlorogensäure	41
V. Untersuchung der Pflanzenasche	
1. Qualitative und quantitative Fluorbestimmung	44
2. Polarographische Bestimmung von Na, K und Ca	46
VI. Diskussion	48
C. Experimenteller Teil	
I. Papierchromatographie	50
II. Dünnschichtchromatographie	51
III. Elektrophorese	52
I-III: 1. Sprühreagenzien für Papierchromatographie, Elektrophorese und Dünnschichtchromatographie	53
2. Qualitative Nachweis- bzw. Gruppenreaktionen	56
IV. Semi-Mikrowasserdampfdestillation	57
V. Mikrosublimation unter vermindertem Druck	58
VI. Ätherische Ölbestimmung	60
VII. Fluor-Bestimmung	61
VIII. Polarographie	64
IX. Veraschungen	
1. Trockene Veraschung	66
2. Nasse Veraschung	67

	Seite
X. Säulenchromatographie	
1. Magnesol-Säule	68
2. Polyamid-Säule	68
3. Zellulose-Säule	69
4. Aluminiumoxyd-Säule	70
XI. Ionenaustauscher-Säulen	
1. Dowex 2	71
2. Lewatit CNS 20	71
3. Amberlite IR 120	72
4. Amberlite IRA 400	72
XII. Craig-Verteilung	73
XIII. Identifizierung der Flavonglykoside A und B sowie der Kaffee- und Chlorogensäure	
1. Gemeinsame Untersuchungsmethoden	
a) Schmelzpunkt	74
b) UV-absorptionsspektrophotometrische Messungen	74
c) Infrarotspektren	74
d) Mikroanalysen	75
2. Charakterisierung von Glykosid A und B	
a) Papierchromatographische Vergleiche	75
b) Tauböck-Test	76
c) Reduktions-Tests	76
d) Eisenchlorid-Test	76
e) Zirkon-Zitronensäure-Test	76
f) Echtblausalz-B-Test	76
g) Hydrolysen	77
h) Quantitative Zuckerbestimmung nach der Anthron- methode	77
i) Darstellung der Osazone	78
k) UV-absorptionsspektrophotometrische Untersu- chungen mit Natriumazetat, Borsäure/Natrium- azetat, Aluminiumchlorid und Aluminiumchlorid/ Natriumazetat	78
l) Azetylierung des Aglykons A	79

A. E i n l e i t u n g

Hand in Hand mit der Pharmakologie werden in letzter Zeit eine Reihe von Drogen, die schon seit vielen Jahren empirisch als Volksheilmittel verwendet werden, einer eingehenden analytischen Untersuchung unterworfen. Ausgelöst wurde diese Entwicklung durch die Einführung moderner Methoden in der Pflanzenanalyse. Dem Pharmakognosten ist es damit möglich, die oft sehr komplizierten Stoffgemische zu zerlegen und die einzelnen Inhaltsstoffe zu identifizieren.

Lycopus europaeus L. ist eine Droge, die in den beiden Präparaten LYCOCYN^{*)} und THYREOGUTT^{**)} gegen Hyperthyreosen und thyreogene Formen der vegetativen Dystonie vielfach verwendet wird. Lycocyn ist ein Auszug des frischen Wolfsfußes (Familie der Labiatae), der durch schonende Aufarbeitung gewonnen wird und neben den noch unbekannten antithyreoid wirksamen Substanzen außerdem noch resorptionsfördernde Stoffe enthalten soll.

Die Droge wurde in mehreren Arbeiten¹⁾²⁾³⁾⁴⁾ im Tierversuch getestet, wobei festgestellt wurde, daß *Lycopus europaeus* den thyreotropen Einfluß der Hypophyse ausschaltet und zu einer allmählichen autonomen Normalisierung der Schilddrüsenfunktion führt. Darüber hinaus konnte ein direkter Antagonismus gegenüber Thyroxin nachgewiesen werden. In weiteren Berichten⁵⁾⁶⁾⁷⁾ aus Klinik und Praxis wird als Nebenwirkung von einer gebesserten oder beseitigten Tachykardie und somit verbesserten Kreislauffunktion und bisweilen von einer recht erheblichen Diurese berichtet.

1) MADAUS, G., KOCH, Fr. E. u. ALBUS, G., Z. ges. exp. Med. 109, 411 (1941)

2) HILLER, E., GIROD, E., Arzneimittel-Forsch. 4, 380 (1954)

3) HILLER, E. u. DEGLMANN, H., Arzneimittel-Forsch. 5, 465 (1955)

4) SCHACH, H., Münchner med. Wschr. 97, 824 (1955)

5) MATTAUSCH, J., Hippokrates 14, 168 (1943)

6) FIEGEL, S., Med. Klin. 49, 1221 (1954)

7) LEPPERT, A., Therapiewoche 2, 571 (1951/52)

*) LYCOCYN der Fa. Dr. Madaus & Co., Köln

**) THYREOGUTT der Fa. Dr. Willmar Schwabe, Karlsruhe

Bisher liegen noch keine Kenntnisse über die wirksamen Stoffe vor.

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war, von *Lycopus europaeus* eine Gesamtanalyse durchzuführen und die Inhaltsstoffe soweit als möglich zu isolieren bzw. strukturell aufzuklären. Hieraus sich ergebende Anhaltspunkte für die Erklärung der empirisch und klinisch festgestellten antithyreoiden Wirkung der Droge sollten in Betracht gezogen werden.

B. Allgemeiner Teil

I. Bisherige Kenntnisse über die Inhaltsstoffe von *Lycopus europaeus* L.

Der einheimische Wolfsfuß (*Lycopus europaeus* L.) ist bisher nur pharmakologisch⁸⁾ näher untersucht worden. Über die Inhaltsstoffe findet man in der Literatur nur ganz allgemeine Angaben. C. WEHMER⁹⁾ berichtet ohne nähere Erklärung von einem ätherischen Öl, einem harzigen, bitter schmeckenden Glykosid "Lycopin"^{*)} und von Äpfelsäure. Nach H. SCHACH¹⁰⁾, der die *Lycopus*-Wirkung an der Rattenschilddrüse getestet hat, soll neben ätherischem Öl, Gerb- und Gallussäure und dem Glykosid "Lycopin" noch Fluor und an weiteren Elementen Kalium vorkommen.

Auch über den nahe verwandten Virginischen Wolfsfuß (*Lycopus virginicus* L.), eine schon seit 1855 in der Homöopathie bekannte Droge¹¹⁾, liegen keine eingehenderen Angaben vor. A. F. SCHIMMEL¹²⁾ berichtet von 0,075% eines unbekannten ätherischen Öles. H. VOLLMER¹³⁾ erwähnt 10,7% Gerbstoff, während K. WEIL¹⁴⁾ Gallus- und Gerbsäure und ein Glykosid "Lycopin" findet.

Im Kaulquappentest¹¹⁾ wurde die antithyreoidale Wirkung festgestellt. Ein Drogenauszug hob die wachstumshemmende und metamorphosefördernde Wirkung des thyreotropen Hormons auf. In der Dämpfung der Schilddrüsenüberfunktion konnte zwischen *Lycopus europaeus* und *Lycopus virginicus* kein Unterschied festgestellt werden.

8) ASSMANN, E., Allg. Hom. Ztg. 195, 54 (1950)

9) WEHMER, C., "Die Pflanzenstoffe", Bd. II, S. 1078, Jena 1931

10) SCHACH, H., Münchner med. Wschr. 97, 25, 824 (1955)

11) SCHINDLER, H., "Inhaltsstoffe und Prüfungsmethoden homöopathisch verwendeter Heilpflanzen", Aulendorf i. Württ. 1955

12) SCHIMMEL, A. F.: Ber. Okt. 1890, 49

13) VOLLMER, H., Arch. exp. Pathol. Pharmacol. 176, 207 (1934)

14) WEIL, K., J. Amer. pharmac. Assoc. 62, 71 (1890)

*) Nicht zu verwechseln mit dem gleichnamigen Carotinoid "LYCOPIN".

II. Voruntersuchung

Da keine Anhaltspunkte über den antithyreoid wirkenden Körper vorhanden waren, mußte eine Gesamtanalyse vorgenommen werden.

Es gibt bisher keinen ausgearbeiteten neuzeitlichen Analysengang, der in ähnlicher Weise wie bei einem anorganischen Substanzgemisch die vollständige Erfassung und Identifizierung aller Bestandteile einer Pflanze garantiert.

Die älteren Methoden nach R. BRIEGER¹⁵⁾, K. STAS-OTTO¹⁶⁾, L. ROSENTHALER¹⁷⁾ und J. ZELLNER¹⁸⁾ beruhen darauf, daß zunächst verschiedene Pflanzenauszüge hergestellt werden. Die damit erfaßten Stoffgruppen trennt man weiter durch fraktionierte Fällung oder auch durch fraktionierte Ausschüttelungen und bestimmt schließlich die Pflanzeninhaltsstoffe mit Hilfe mehr oder weniger spezifischer chemischer Farbreaktionen. Die Aufteilung in Fraktionen nach unterschiedlicher Löslichkeit führt aber selten zu chemisch zusammengehörenden Verbindungen.

Nach K. PAECH und M. V. TRACEY¹⁹⁾ oder L. ZECHMEISTER²⁰⁾ wird die Droge ebenfalls zunächst mit verschiedenen Lösungsmitteln extrahiert. Die weitere Auftrennung der Extrakte erfolgt dann mit neuzeitlichen Verfahren, z. B. mit Ionenaustauschern (Austauschanalyse)²¹⁾, mittels Säulenchromatographie (Adsorptionsanalyse oder Verteilungsanalyse)²²⁾²³⁾ oder mit Hilfe der Craig-Verteilung. Die anschließende Identifizierung der Stoffgruppen bzw. der Einzelstoffe kann dann mit der Papierchromatographie, der Dünnschichtchromatographie, der Elektrophorese und mit kolorimetrischen bzw. UV-spektrophotometrischen Messungen vorgenommen werden.

15) BRIEGER, R. in KLEIN, G. "Handbuch der Pflanzenanalyse", Bd. I, Wien 1931

16) STAS-OTTO, K. in ibid. Bd. I, S. 586

17) ROSENTHALER, L., Arch. Pharmaz. Ber. dtsh. pharmaz. Ges. 57 (1902)

18) ZELLNER, J., Arch. Pharmaz. Ber. dtsh. pharmaz. Ges. 381 (1924)

19) PAECH, K. u. TRACEY, M. V. "Moderne Methoden der Pflanzenanalyse", Bd. I, Berlin-Göttingen-Heidelberg 1956

20) ZECHMEISTER, L., "Fortschritte der Chemie organischer Naturstoffe", Wien 1955

21) PARTRIDGE, S. M., Analyst (London) 77, 955 (1952)

22) BRAUNITZER, G. in PAECH, K. u. TRACEY, M. V. "Moderne Methoden der Pflanzenanalyse", Bd. I, Bln.-Gött.-Heidelbg. 1956

23) LEEB, W., Dissertation, München 1958

1. Qualitative Untersuchungen

Wir stellten mit verschiedenen Lösungsmitteln Pflanzenauszüge 1. durch Kaltmazeration und 2. durch Extraktion im Soxhlet her. Die filtrierten Auszüge und die anschließend hergestellten wässerigen Extrakte wurden papierchromatographisch bzw. mit der Papierelektrophorese untersucht.

Die Reihenfolge der Auszüge wurde wie folgt gewählt:
Petroläther - Äther - Chloroform - Methanol und Äthanol - neutraler wässriger Auszug - saurer wässriger Auszug.

1) PETROLÄTHER-AUSZUG:

Darin sind vorwiegend Fette, fette Öle, ätherische Öle, Wachse, Cumarine, Lipoidsubstanzen, Phytosterine, Harze und Chlorophyll gelöst.

2) ÄTHER-AUSZUG:

Diese Fraktion enthält Glykoside, Alkaloide, Cumarine, Harze, Farbstoffe und vereinzelt Säuren, wie z.B. freie mehrbasische Carbon-säuren.

3) CHLOROFORM-AUSZUG:

Er enthält noch den Rest des Chlorophylls, Phosphorsäureester, Cumarine und kautschukartige Stoffe.

4) METHANOL- und 70%iger ÄTHANOL-AUSZUG:

Darin ist die Hauptmenge der Glykoside und organischer Säuren gelöst; ferner Alkaloide, Gerbstoffe, Bitterstoffe, Saponine, Aminosäuren und Zucker in geringen Mengen.

5) NEUTRALER WÄSSERIGER AUSZUG:

Er enthält Zucker, Schleim, Eiweiß, Saponine, Pflanzengummi und Salze.

6) SAURER WÄSSERIGER AUSZUG:

Er enthält die Hauptmenge der Alkaloide, besonders wenn bei der Extraktion mit Äthanol oder Methanol kein Zusatz von Säure verwendet wird, ferner schwerlösliche Salze und Eiweißstoffe.

Außerhalb dieser Reihe wurden noch Auszüge mit:

AZETON (Säuren als Inhaltsstoffe),

PENTAN und BENZIN (ähnlich Petroläther) hergestellt.

Die verschiedenen Fraktionen wurden zur qualitativen Untersuchung auf einzelne Stoffgruppen herangezogen.

a) Prüfung auf Flavonglykoside

Hierfür chromatographierten wir den wässrigen Extrakt des Methanolauszuges in den Fließmitteln (siehe Abb. 1, S. 7):

Äthylazetat/Ameisensäure/Wasser (10 : 2 : 3)

Butanol/Eisessig/Wasser (4 : 1 : 5)

Isopropanol/Ameisensäure/Wasser (2 : 5 : 5).

Die entwickelten Chromatogramme besprühten wir mit 5%iger Aluminiumsulfatlösung²⁴⁾, wobei sich ein vorher im UV-Licht dunkel erscheinender Punkt als gelbgrün fluoreszierender Fleck zeigte. Dieser erfuhr in NH₃-Atmosphäre eine Farbveränderung nach gelb, während mit basischem Bleiazetat besprüht der Fleck im UV-Licht ocker wurde²⁵⁾. Diese Farbkomplexe treten bei den Anthoxanthinen auf²⁶⁾.

Daß neben dem erstgenannten und später als Luteolin-7-glucosid erkannten Flavon noch ein zweites Glykosid vorlag, ergab sich erst bei der Überprüfung des Extraktes durch die Papierelektrophorese. Als Lösungsmittel verwendeten wir Pyridin/Essigsäure/Methanol/Wasser mit einem p_H-Wert von 5,2 - 5,4. Die Pflanzensäuren wanderten zur Anode, die Flavonglykoside dagegen eine kurze Strecke zur Kathode, während die Ballaststoffe an der Startlinie sitzenblieben. Nach Besprühen des Streifens mit Bleiazetat, erschien neben einem breiten ockerfarbenen Streifen noch eine zweite gelbgrüne Zone, die ein zweites Glykosid vermuten ließ. Die späteren Isolierungsversuche führten zu einem Apigenin-7-glucosid.

24) PARIA, R., Bull. Soc. Chim. biol. 34, 767 (1952)

25) RAO, T. u. SESHADRI, T. A., Proc. Indiana Acad. Sci. 171, 119 (1943)

26) LINSKENS, H. F., "Papierchromatographie in der Botanik", S. 206, Berlin-Göttingen-Heidelberg 1955

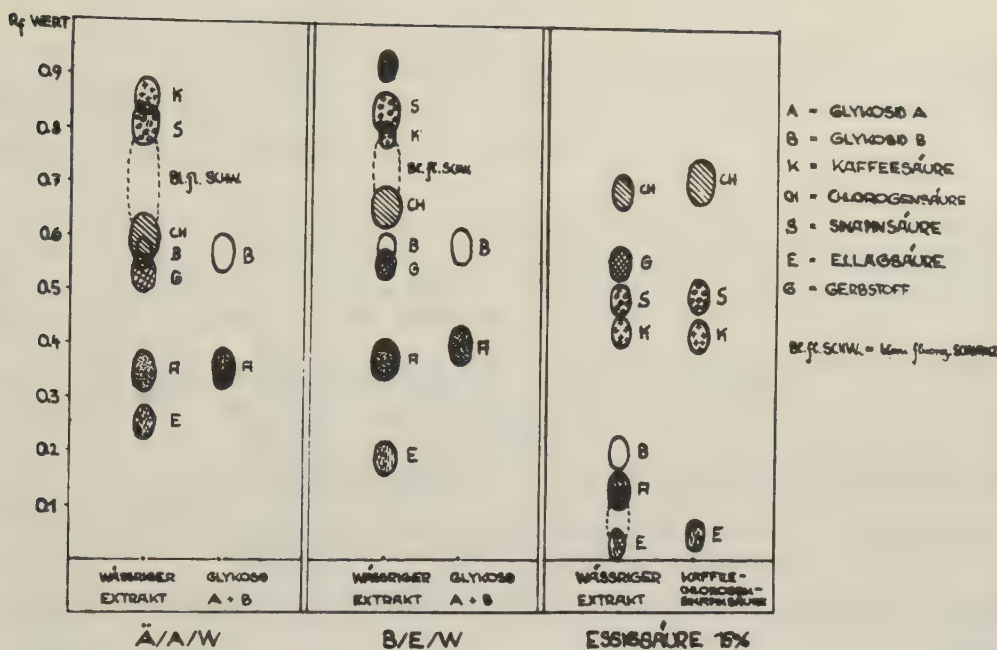


Abbildung 1

b) Prüfung auf organische Pflanzensäuren

Zur Prüfung auf Säuren zogen wir zunächst den wässrigen Extrakt des Methanol- oder Äthanolaustrages, sowie die Azetonfraktion heran. Besser geeignet erwies sich der in heißem Wasser gelöste Rückstand einer Äthylazetatausschüttelung des wässrigen Extraktes.

Gute und klare Ergebnisse erhielten wir mittels Ionenaustauscher²⁷⁾. Der Pflanzenauszug wurde zuerst durch einen sauren Kationenaustauscher (AMBERLITE IR 120)^{*)} gegeben, wobei alle Kationen zurückgehalten wurden, während Säuren, Zucker und andere indifferente Stoffe durchliefen. Die sauer reagierende Flüssigkeit gaben wir dann auf eine basische Säule (AMBERLITE IRA 400)^{*)}, welche ihrerseits die Säuren zurückhielt, während Zucker und andere indifferente Stoffe durchliefen. Dieses Filtrat verwendeten wir später zur zweiten Bestimmung der freien Zucker. Die Säuren wurden aus dem basischen Anionenaustauscher mit Alkali in Freiheit gesetzt und

27) SVENDSEN, A.B., "Zur Chemie norwegischer Umbelliferen", Oslo, 1954

*) Amberlite IR 120 und IRA 400 der Fa. Roehm u. Haas Co. Philadelphia, Pennsylvania

erscheinen im Filtrat als Salze. Aus ihnen konnten die Säuren durch Passieren einer stark sauren Kationenaustauscher-Säule (LEWATIT CNS)^{*)} freigemacht werden.

Der Nachteil dieser Methode besteht darin, daß eventuell depsidartige Verbindungen, wie es z. B. die Chlorogensäure ist, durch einen stark alkalischen Ionenaustauscher in nicht unerheblichen Mengen gespalten werden können.

Zur chromatographischen Untersuchung wurden die Lösungsmittelsysteme:

15%ige Essigsäure

2%ige Essigsäure

Phenol/Wasser (1 : 1) als Zweikomponentensystem

sowie

Butanol/Essigsäure/Wasser (4 : 1 : 5)

Essigester/Ameisensäure/Wasser (10 : 2 : 3) als

Dreikomponentensysteme verwendet. Bei der späteren Identifizierung der Säuren erwies sich der Vergleich der beiden Systeme durch den auftretenden Wechsel der R_f -Werte als sehr nützlich. Als geeignetstes Laufmittel erwies sich 15%ige Essigsäure (siehe Abb.1, S.7).

In Essigsäure erschienen hierbei vier bis fünf voneinander getrennte Flecken, die mehr oder weniger stark im UV-Licht blau bis violett fluoreszierten. Diese Fluoreszenzerscheinung tritt bei allen nicht hydrierten 1,2-Dihydroxy- und 1,2,3,-Trihydroxy-zimtsäure-derivaten, sowie bei entsprechenden Cumarinen und Lignanen auf²⁸⁾.

Durch Besprühen mit 1%iger Eisen-III-chloridlösung wurde die Zugehörigkeit von drei Punkten zu mehrwertigen Phenolen erkannt. Auf dem Chromatogramm zeigten sich graugrüne Flecken.

Mit einem spezifischen Sprühreagens auf aliphatische Säuren, und zwar mit einer 4%igen Lösung von p-Dimethyl-aminobenzaldehyd in Essigsäure-anhydrid wurde diese Stoffgruppe ausgeschieden²⁹⁾. In unserem Falle trat keine Farbreaktion ein.

Der Verdacht auf Oxyzimtsäure-Derivate wurde weiter durch die Fluoreszenz im UV-Licht nach Bedampfen mit Ammoniak bekräftigt. Laut K. HERRMANN tritt bei allen Estern der Kaffee- und Ferulasäure ein Farbumschlag von blauer zu grüner Fluoreszenz ein³⁰⁾. Der tief-

28) HERRMANN, K., Pharmazie 11, 435 (1956)

29) DENECKE, W., Dissertation, München 1957

30) HERRMANN, K., Naturwissenschaften 5, 112 (1958)

*) Lewatit CNS der Fa. Farbenfabriken Bayer, Leverkusen.

sitzende Punkt mit einem R_f -Wert von 0,45 blieb bei dieser Reaktion hellblau, während der Fleck mit dem R_f -Wert 0,49 blaugrün und der Punkt mit einem R_f -Wert von 0,71 gelbgrün wurde.

Wie später festgestellt wurde, handelte es sich um K a f f e e - , C h l o r o g e n - und S i n a p i n s ä u r e .

Der unterste violett fluoreszierende Punkt mit einem R_f -Wert von 0,02 wurde mit Ammoniak blaßgelb und erwies sich später als E l l a g s ä u r e .

c) Prüfung auf Cumarine

Bei der Papierchromatographie ist die stark blaue Fluoreszenz mitunter von großer diagnostischer Bedeutung zur Erkennung von Cumarinen³¹⁾. Man bedient sich der Fluoreszenz der Stoffe vor und nach dem Behandeln mit Alkalihydroxyd.

W. BORSCHÉ³²⁾ hat nachgewiesen, daß Cumarine, sofern sie als Cumarinsäuren vorliegen und ein freies Hydroxyl enthalten, sich mit diazotierten Verbindungen unter Bildung von Farbstoffen kuppeln lassen. So kann man nach der Alkalihydroxydbehandlung auf dem nämlichen Chromatogramm noch eine Diazoreaktion ausführen.

Zur chromatographischen Prüfung wurden vier nach den theoretischen Erwägungen in Frage kommende Fraktionen verwendet und zwar der Äther-, der Chloroform-, der Petroläther- und der Benzinauszug. Die freien Cumarine sind infolge ihres hydrophoben Charakters damit gut extrahierbar.

Als Fließmittel verwendeten wir Petroläther^{*)}/ Benzol p.a./ Methanol 95%ig (100:5:5)³³⁾.

Es trat zum Teil keine bzw. nur ganz schwache blaue Fluoreszenz auf, während die Testsubstanz Umbelliferon deutlich blau fluoreszierte. Nach dem Besprühen mit 1%iger äthanolischer Kalilauge trat keine wesentliche Veränderung ein, während die Test-

31) CASPARIS, P. u. MANELLA, E., Pharmac. Acta Helvetiae 18, 714 (1943); ibid. 19, 158 (1944)

32) BORSCHÉ, W., Ber. dtsch. chem. Ges. 37, 346 (1904)

33) BAERHEIM-SVENDSEN, A., "Zur Chemie norwegischer Umbelliferen", S. 36, Oslo 1954

*) Petroläther MERCK, spez. Gew. 0,660 - 0,680

substanz kräftig blau aufleuchtete. Mit diazotierter Sulfanilsäure zeigten sich im besten Falle schwach fleischfarbene Flecke, während Umbelliferon eine stark rote Reaktion ergab.

Daraus und aus den negativ verlaufenen Mikrosublimationsversuchen konnte angenommen werden, daß keine Cumarine vorlagen.

d) Gerbstoffe

Da in den Arbeiten von K. WEIL und H. VOLLMER³⁴⁾³⁵⁾ in der nahe verwandten *Lycopus virginicus* Gallus- und Gerbsäure als Inhaltsstoffe angegeben wurden, prüften wir auch bei *Lycopus europaeus* auf Gerbstoffe.

Als allgemeine qualitative Gerbstoffreaktion wurde nach H. GNAMM³⁶⁾ die Fällung mit Gelatine-Lösung durchgeführt. Einen Auszug der Warmwassermazeration versetzten wir vorsichtig tropfenweise mit 0,5%iger Gelatinelösung. Es entstand eine weißliche Fällung. In ähnlicher Weise prüften wir den methanolischen Auszug mit 0,1%iger Brucinlösung. Auch hier ergab sich eine schwache Fällung.

Bei der papierchromatographischen Untersuchung der oben genannten Extrakte zeigte sich im System Essigsäure, 15%ig jeweilig ein Fleck mit dem R_f -Wert 0.55, der keiner der gefundenen Säuren exakt zugeordnet werden konnte. Er fluoreszierte im UV-Licht schwach blau bis violett und gab mit den Sprühreagenzien ähnliche Reaktionen wie Kaffee- und Chlorogensäure.

B. HESSE³⁷⁾ und C. H. BRIESKORN³⁸⁾, die über Salbei arbeiteten, wiesen bereits in ihren Arbeiten darauf hin, daß es sich bei dem Salbeigerbstoff um keinen Catechingerbstoff handle. K. HERRMANN isolierte später aus *Melissa officinalis*, *Salvia officinalis* und *Mentha piperita* einen Gerbstoff, der hinsichtlich seiner elementaren Zusammensetzung, der Zahl der OH-Gruppen und der aktiven H-Atome weitgehend mit der Kaffeesäure übereinstimmte³⁹⁾.

34) WELL, K., J.Amer.pharmac.Assoc. 62, 71 (1890)

35) VOLLMER, H., Naunyn-Schmiedebergs Arch.exp.Pathol.Pharmakol. 176, 207, 550 (1934)

36) GNAMM, H., "Die Gerbstoffe und Gerbmittel", S.55, Stuttgart 1949

37) HESSE, B., Pharmazie 2, 282 (1947)

38) BRIESKORN, C. H., Pharmac.Acta Helvetiae 24, 51 (1949)

39) HERRMANN, K., Arch.Pharmaz.Ber.dtsch.pharmaz.Ges. 287/59, 142 (1954)

Mittels präparativer Papierchromatographie erhielten wir ein reines methanolisches Eluat dieses vermutlichen Kaffeesäuregerbstoffes. Nach der Hydrolyse mit 10%iger Kalilauge und anschließendem Ausäthern des Hydrolysates zeigte sich auf dem Chromatogramm ein hellblau fluoreszierender Punkt, der in derselben Höhe lag wie mitgelaufene authentische Kaffeesäure. Chinasäure konnte nicht nachgewiesen werden. Das UV-Spektrum besaß neben einem Maximum bei 285 mμ die für Hydroxy-Zimtsäuren charakteristische breite Bande mit einem Maximum bei 328 mμ.

Auf Grund dieser Ergebnisse ist anzunehmen, daß es sich um den von K. HERRMANN⁴⁰⁾ in allen Labiaten papierchromatographisch nachgewiesenen Kaffeesäuregerbstoff handelt.

e) Aminosäuren

In den letzten Jahren wurden besonders grüne Pflanzenteile näher auf Aminosäuren untersucht. Insbesondere in höheren Pflanzen trifft man freie Aminosäuren und dazu die entsprechenden Ketosäuren an⁴¹⁾. Außer den bekannteren Säuren, die mehr oder weniger Zwischenstufen der Aminosäuren- bzw. der Flavonbiosynthese sind, wie z. B. Alanin oder Phenylalanin, verdienen die in letzter Zeit entdeckten schwefelhaltigen Aminosäuren besonders hervorgehoben zu werden. Davon ist das aus Kohl isolierte Methyl-sulfoniumderivat des Methionins zu erwähnen⁴²⁾.

Zur chromatographischen Prüfung wurde der Äthanolauszug (70%iger Alkohol) verwendet.

Außer den Aminosäuren gehen dabei zahlreiche andere organische Verbindungen in Lösung. Um die Aminosäuren vom größten Teil dieser Stoffe abzutrennen, gaben wir die Lösung auf eine IR120-Amberlite-Säule. Die in der Säule verbliebenen Aminosäuren und eventuell vorhandene niedermolekulare Peptide wurden mit 1n-Ammoniak eluiert⁴³⁾. Dieses eingeengte Eluat chromatographierten

40) HERRMANN, K., unveröffentlicht; ref. Pharmazie 11, 440 (1956)

41) VIRTANEN, A. I., Angew.Chem. 67, 381 (1955)

42) McRORIE, R.A., SUTHERLAND, G.L., LEWIS, M.S., BARTON, A.D., GLAZENER, M.R. u. SHIVE, W., J.Amer.chem.Soc. 76, 115 (1954)

43) VIRTANEN, A.I., Angew.Chem. 67, 385 (1955)

wir zur ersten Orientierung aufsteigend mit drei verschiedenen Lösungsmittelgemischen:

Butanol/Eisessig/Wasser ⁴⁴⁾	(4:1:1)
Phenol/Wasser ⁴⁵⁾	(80:20)
Pyridin/Butanol/Eisessig/Wasser ⁴⁶⁾	(20:30:6:24).

Es zeigten sich nach dem Entwickeln mit Ninhydrin⁴⁷⁾ mehrere blaue bis violette Flecke, die sich in Art eines Streifens (R_F -Wert von 0.15 bis ca. 0.65) eng aneinander reihten.

Mittels zweidimensionaler Papierchromatographie in den Systemen

a) Butanol/Eisessig/Wasser (4:1:1)

b) Phenol/Wasser (80:20)

konnten die Gemische aufgetrennt und authentischen Substanzen^{*)} zugeordnet werden. Zur weiteren Prüfung wurden Durchlaufchromatogramme (B/E/W Laufzeit: 50-55 Stunden) gemeinsam mit Testsubstanzen angefertigt, wobei sich die Aminosäuren gut auftrennten.

Die mit Ninhydrin entwickelten Chromatogramme brachten wir zuletzt nach I. SZANTAI⁴⁸⁾ in eine HCL-Gas-Atmosphäre und beobachteten die Farbveränderung der einzelnen Flecke nach 1 Minute, nach 6 Minuten und nach 20 Minuten.

Auf Grund der Untersuchungsergebnisse ergaben sich folgende Aminosäuren: Tyrosin, Methionin, Threonin, Asparaginsäure, Phenylalanin und Glutaminsäure.

44) REED, L. J., J.biol.Chemistry 183, 451 (1950)

45) GORDON, A. H., CONDSSEN, R. J., MARTIN, A. J. P., Biochem. J. 38, 224 (1944)

46) WUNSCH, E., Dissertation, München 1956

47) CONDSSEN, R. J., GORDON, A. H., MARTIN, A. J. P., Biochem. J. 38, 224 (1944)

48) SZANTAI, I., Rev. Chim. 8, 544 (1957)

*) Wir danken dem Max-Planck-Institut für Eiweiß- und Lederforschung, München (Direktor: Prof.Dr.W.Grassmann) für die freundliche Überlassung von Testsubstanzen.

T a b e l l e 1

Aminosäuren	B/E/W	Phenol/ Wasser	P/B/E/W	1 Min.	6 Min.	20 Min.
Tyrosin	0.45	0.64	0.336	braun- violett	hellbraun	hellbraun
Methionin	0.55	0.90	0.390	orange	orange	orange
Threonin	0.35	0.50	0.180	gelb	gelb	gelb
Asparagin- säure	0.24	0.15	0.142	rot	rotviolett	rotviol.
Phenylala- nin	0.68	0.89	0.550	violett	violett	violett
Glutamin- säure	0.30	0.25	0.165	orange- rot	orange	orange

f) Saponine

Da bei der Zubereitung von wässerigen Extrakten die Abscheidung des Chlorophylls verzögert oder verhindert wurde und beim Schütteln von wässerigen Lösungen starke Schaumbildung eintrat, vermuteten wir das Vorhandensein eines oberflächenaktiven Stoffes. Dazu zählen in der Pflanze vor allem die Saponine.

Unter Saponinen versteht man in der üblichen Begriffsfassung hochmolekulare, stickstofffreie Glykoside⁴⁹⁾, die sich außer ihrer starken Oberflächenaktivität⁵⁰⁾ noch durch eine ausgeprägte hämolytische Wirksamkeit⁵¹⁾ auszeichnen. R. TSCHESCHE und A. HEESCH⁵²⁾ wiesen kürzlich darauf hin, daß eine genauere Einteilung nach chemischen Gesichtspunkten zu fordern ist. Die von R. KOBERT⁵¹⁾ entdeckte hämolytische Wirksamkeit kann sowohl zum qualitativen Nachweis als auch zu einer quantitativen Bestimmung verwendet werden.

Zur Untersuchung verwendeten wir eine methanolische Pflanzenextraktlösung und versetzten diese mit absolutem Alkohol (2 Teile

49) MADAUS, G., "Lehrbuch der Biologischen Heilmittel", Leipzig 1938, Bd. I, S. 32

50) PAECH, K. u. TRACEY, M. V., "Moderne Methoden der Pflanzenanalyse, Berlin-Göttingen-Heidelberg 1955, Bd. III, S. 67

51) KOBERT, R., Arch.exp.Pathol.Pharmakol. 22, 259 (1887)

52) TSCHESCHE, R. u. HEESCH, A., Chem.Ber. 85, 1067 (1952)

Extraktlösung + 1 Teil Äthanol)⁵³⁾. Das hierbei ausgefallene bräunlichgelbe Produkt enthielt neben anderen hydrophilen Stoffen in der Hauptsache Saponine. Von diesem Präzipitat stellten wir einen Trockenextrakt her, lösten davon abgewogene Mengen in jeweils gleichen Volumina blutisotonischer Kochsalzlösung (0.85%ig) und gaben dazu die gleiche Menge einer Blutkörperchenaufschwemmung. Nach einer Stunde war in den konzentrierteren Drogenlösungen vollständige Hämolyse eingetreten. Eine ebenfalls positive Reaktion ergab sich mit Blutgelatine⁵⁴⁾. Wurden einige Körnchen des Trockenextraktes auf Blutgelatine gebracht, so zeigte sich in mehreren Fällen ein hämolytischer Hof.

Nach N. L. DUTTA⁵⁵⁾ lassen sich Saponine im System Butanol/Eisessig/Wasser (4:1:2) chromatographieren. Die Charakterisierung der Saponindrogen erfolgt auf dem getrockneten Papier durch Besprühen mit Blutlösung⁵⁶⁾, wobei sich die Saponine durch die dabei auftretende Hämolyse zu erkennen geben.

Wir unterwarfen einen wässrigen Auszug des Drogenmaterials dieser chromatographischen Untersuchung. Bei einem R_F -Wert von ca. 0.90 - 0.95 trat ein hämolytischer Hof auf.

Da keine isolierte reine Substanz vorlag und auch nicht mit einer therapeutisch wichtigen Bedeutung der Saponine zu rechnen war, wurde eine engere Charakterisierung nicht mehr vorgenommen.

g) Alkaloide

Im Pflanzenreich können die Alkaloide vermutlich als "Abfallprodukte" des Eiweißstoffwechsels betrachtet werden. Sie kommen hauptsächlich in den peripheren Pflanzenteilen vor, also auch in den Blättern, die wir als Drogenmaterial vorliegen haben⁵⁷⁾.

Untersucht wurden hierauf (a) der saure wässrige Auszug, (b) die Äther-, (c) die Äthanol- und (d) die Azetonfraktion. Als Fließ-

53) PROBST, W., Dissertation, München 1958

54) FISCHER, R., "Praktikum der Pharmakognosie", Wien 1952

55) DUTTA, N. L., Nature (London) 175, 85 (1955)

56) BUTZ, W., Pharmac. Acta Helvetiae 20, 296 (1945)

57) MOTHES, K. u. ROMEIKE, A., "Handbuch der Pflanzenphysiologie", Bd. VIII, S. 1014, Berlin-Göttingen-Heidelberg 1958

mittel verwendeten wir: Toluol/Isobutanol (1:1)
Butanol/Eisessig/Wasser (10:1:4)
Butanol/Ameisensäure/Wasser⁵⁸⁾ (12:2:7)
Äthylazetat/Ameisensäure/Wasser (10:2:3)
Isopropanol/Ameisensäure/Wasser (2:5:5).

Die Chromatogramme wurden nach dem Trocknen mit einem modifizierten Dragendorff-Reagens nach R. MUNIER und M. MACHEBOEUF⁵⁹⁾ schwach besprüht. Mitgelaufene Testsubstanzen zeigten sich als deutlich orange Flecken, die sich kräftig vom orangebraunen Grund abhoben. Unsere aufgetragenen Extraktlösungen gaben in keinem Falle eine positive Reaktion. Ein Teil der Chromatogramme wurde noch nach O. E. SCHULTZ⁶⁰⁾ mit konzentrierter Salpetersäure (D = 1.4) besprüht. Auch in diesem Falle ergab sich eine negative Reaktion.

Um eine eventuell konzentriertere Alkaloidlösung zu erhalten, versetzten wir die Extraktlösungen mit 5%iger Ammoniak-Lösung, gaben diese Lösungen auf eine Aluminiumoxydsäule und eluierten mit Chloroform die evtl. freigewordenen Alkaloidbasen. Die eingeeengten Eluate enthielten keine Alkaloide.

Auf Grund dieser Ergebnisse kann gesagt werden, daß in *Lycopus europaeus*, wie in allen Labiaten, kein Alkaloid als Inhaltsstoff enthalten ist.

h) Phosphatide und Phosphorsäureester

Da in Veröffentlichungen der letzten Zeit darauf hingewiesen und mit großer Wahrscheinlichkeit angenommen wird, daß die Phospholipide im Funktionsablauf der Schilddrüsen eine ausgesprochen zentrale Rolle spielen sollen⁶¹⁾, prüften wir auch auf diese Stoffgruppe.

Wir chromatographierten auf Formaldehyd-Papier⁶²⁾ den wässrigen Extrakt, einen Chloroform- und einen Chloroform-Methanol-Auszug (3:2) in den Systemen:

58) BÜCHI, I. u. SCHUMACHER, H., *Pharmac.Acta Helvetiae* 32, 462, 275 (1957)

59) MUNIER, R. u. MACHEBOEUF, M., *Bull.Soc.chim.biol.* 33, 846 (1951)

60) SCHULTZ, O.E. u. STRAUSS, D., *Arzneimittel-Forsch.* 5, 6, 342 (1955)

61) FREINKEL, N., *Biochem.J.* 68, 327 (1958)

62) RICHTER, G., Dissertation, München 1958

Butanol/Eisessig/Wasser (4:1:5)

Methanol/Isopropanol/Ammoniak/Wasser (45:30:15:10)

Pro 100 ml Gemisch wurden 0,2 ml einer 0,1 m wässerigen Lösung von Äthylendiamintetraessigsäure zur Bindung der Kationen zugesetzt⁶³⁾.

Die Chromatogramme wurden in der Reihenfolge mit

Ninhydrin

Phosphormolybdänsäure und

Rhodamin entwickelt.

Weitere Chromatogramme entwickelten wir getrennt mit Nilblau und mit Ammoniummolybdat.

Mit Ninhydrin⁶⁴⁾, dem Reagens auf freie NH_2 -Gruppen, zeigten sich die relativ tiefsitzenden Aminosäuren.

Mit 1%iger wässriger Phosphormolybdänsäurelösung⁶⁵⁾ dem spezifischen Reagens auf cholinhaltige Phosphatide, trat keine Farbreaktion ein.

Mit 0,1%iger Rhodamin-B-Lösung⁶⁶⁾ trat nahe an der Lösungsmittelfront eine schwach positive Reaktion auf, die wohl nicht durch das Vorhandensein von Phospholipoiden, sondern durch Fettsäuren, wie z.B. Linolensäure, hervorgerufen wurde. Diese positiv reagierenden Flecken konnten auch bei den Äther- bzw. Benzinauszügen beobachtet werden.

Mit 0,1%iger Nilblaulösung⁶⁷⁾, die vor allem saure Lipide und freie Fettsäuren anzeigt, reagierten mehrere Punkte blau. Diese Farbreaktion kann aber auch von anderen Stoffen hervorgerufen werden.

Mit dem Ammoniummolybdat-Reagens⁶⁸⁾, das auf einer Phosphorreaktion beruht und phosphorhaltige Lipide sowie Phosphorsäureester anzeigt, trat bei einem R_f -Wert von 0.119 ein blauer Fleck auf.

64) CRAMER, F., "Papierchromatographie", Weinheim/Bergstr. 1954

65) DOUSTE-BLAZY, L., POLONOVSKI, J. u. VALDIGUIE, P., C.R. hebdomadaire des Seances Acad. Sci., Paris 235, 1643 (1952); ref.: C.A. 47, 5981a (1953)

66) MARINETTI, G. V. u. STOTZ, E., J. Amer. chem. Soc. 77, 6668 (1955)

67) HACK, J. H., Biochem. J. 54, 602

68) HANES, C. S. u. ISTERWOOD, F. A., Nature (London) 164, 1107 (1949)

63) GERLACH, E. u. JANKE, J., Biochem. Z. 330, 565 (1958)

Auf Grund dieser Untersuchungen ist mit der Gegenwart von Phospholipiden in *Lycopus europaeus* in größerer Konzentration nicht zu rechnen.

1) Freie Zucker

Da beim Preßsaft, sowie in wässerigen Auszügen beim Stehenlassen an der Luft sehr schnell Schimmelbildung eintrat, lag die Vermutung auf freie Zucker sehr nahe. Außerdem sind Zucker fast in jeder Pflanze vorhanden.

S. MURAKAMI⁶⁹⁾ isolierte aus der Wurzel von *Lycopus lucidus* Lycopose, ein Hexasaccharid, das sich bei der Hydrolyse in 5 Teile Galactose und 1 Teil Fructose spaltet.

Zu unserer Untersuchung verwendeten wir das Filtrat aus der basischen Amberlite-Säule, das wir schon bei der Prüfung auf organische Säuren zur Zuckerbestimmung bereitgestellt hatten. Die zuckerhaltige Lösung wurde unter vermindertem Druck eingeeengt und im System Pyridin/Essigester/Wasser (1:2:2) chromatographiert. Nach dem Entwickeln mit Anilinphthalat⁷⁰⁾ zeigten sich zwei braune Flecken mit den R_f -Werten 0,46 und 0,43, die authentischer Glucose und Galactose zugeordnet werden konnten.

Bei einer weiteren Versuchsanordnung wurde der mit Wasser verdünnte Preßsaft auf eine Perlonsäule gegeben und dann mit Wasser eluiert. Die ersten fünf Fraktionen faßten wir zusammen, engten sie ein und prüften sie papierchromatographisch. Auch hier konnten wir G l u c o s e und G a l a c t o s e nachweisen.

Von den Zuckerlösungen wurde weiter das Gemisch der beiden Osazone hergestellt. Da nur d-Galactose-phenyl-osazon in heißem Wasser leicht löslich, während d-Glucose-phenylosazon in heißem Wasser unlöslich ist, konnten beide Osazone voneinander getrennt werden⁷¹⁾. Die Schmelzpunkte 205-208° C für GLUCOSAZON und 188-191° C für GALACTOSAZON stimmen mit den authentischen Osazonen überein. Im Mischschmelzpunkt trat keine Depression auf.

69) MURAKAMI, S.: Acta phytochim. (Tokyo) 13, 37 (1942); ref. C.A. 45, 3465g (1951)

70) PARTRIDGE, S.M., Nature (London) 164, 443 (1949)

71) VOGEL, H. u. GEORG, A.: "Tabellen der Zucker und ihrer Derivate", Berlin, 1931

k) Unverseifbarer Rückstand

Da der Petrolätherauszug nach Abdestillieren des Lösungsmittels einen recht beachtlichen Rückstand hinterließ, untersuchten wir diese Fraktion näher.

Wir gingen nach einem von R. BRIEGER⁷²⁾ beschriebenen Arbeitsgang vor, wobei sich bei der Prüfung mit α -Naphthol auf Glykoside und Dragendorffs-Reagens auf Alkaloide keine positiven Reaktionen zeigten. Der von den wasserlöslichen Teilen befreite Petrolätherauszug wurde laut Vorschrift weiter behandelt und in einen verseifbaren und in einen unverseifbaren Anteil aufgetrennt.

Der unverseifbare Rückstand betrug 0.035 - 0.04%, war rötlich bis orangegelb und löste sich leicht in Schwefelkohlenstoff, in Chloroform und Benzol, nicht aber in Äthanol und Methanol. Das Absorptionsspektrum dieses in Schwefelkohlenstoff gelösten Stoffes wies auf Carotinoide hin⁷³⁾⁷⁴⁾⁷⁵⁾. Wir erhielten Absorptionsbanden, die zwischen 450 m μ und 520 m μ lagen. Nach L. ZECHMEISTER wurden mehrere Farbreaktionen durchgeführt, die eindeutig C a r o t i n, bestehend aus α - und β -Carotin, ergaben.

Die papierchromatographischen Untersuchungen waren ebenfalls identisch mit den für Carotin in der Literatur⁷⁶⁾⁷⁷⁾ aufgezeichneten Angaben. Es zeigten sich in den Lösungsmitteln Toluol und Monochlorbenzol gelbe Flecken nahe der Lösungsmittelfront, die im UV-Licht grünlich fluoreszierten.

72) BRIEGER, R. in KLEIN, G.: "Handbuch der Pflanzenanalyse", Bd. I, S. 581, Wien 1931

73) ZECHMEISTER, L. "Carotinoide", Berlin 1940

74) ZECHMEISTER, L. in KLEIN, G.: "Handbuch der Pflanzenanalyse", Bd. III/2, S. 1274, Wien 1932

75) WINTERSTEIN, A. in KLEIN, G.: "Handbuch der Pflanzenanalyse", Bd. IX/2, S. 1403, Wien 1933

76) BAUER, L.: Naturwissenschaften 39, 88 (1952)

77) STRAIN, H. H.: J. phys. Chem. 57, 638 (1953)

2. Nachweis flüchtiger Stoffe

a) Mikro-Wasserdampfdestillation

Die Mikrowasserdampfdestillation ist im allgemeinen als eine schonende Darstellungs- bzw. Isolierungsform anzusehen, so daß man bei vielen der gewonnenen Körper mit Recht annehmen kann, daß sie als solche im Pflanzenorganismus bereits vorgebildet existieren. Bei einer Reihe von Stoffen, z.B. bei esterartigen Verbindungen, wird man jedoch mit der gegenteiligen Tatsache rechnen müssen. Dort werden die betreffenden Stoffe erst durch Hydrolyse aus ihrer ursprünglichen Bindung in Freiheit gesetzt.

Bei der Untersuchung des gerebelten bzw. pulverisierten Drogenmaterials verwendeten wir eine nach N. D. CHERONIS⁷⁸⁾ vorgeschlagene Semimikro-Wasserdampfdestillations-Apparatur. Die von dem Autor beschriebene Anordnung änderten wir etwas ab und erreichten damit eine bessere und schnellere Kondensation der flüchtigen Stoffe.

Mittels Papierchromatographie (absteigend im System Äthanol/Ammoniak konz./Wasser, 80:4:16) konnte nach dem Besprühen mit Bromphenolblau Essigsäure (R_f -Wert = 0.53) nachgewiesen werden.

Das Kondensat hatte einen stark aromatischen Geruch und zeigte an der Oberfläche hellgelbe Öltröpfchen.

b) Ätherische Öle

Die Vermutung, daß ätherische Öle vorliegen, wurde durch die mikroskopische Prüfung der Blattdroge bekräftigt. Im Flächenschnitt, wie auch im Querschnitt zeigten sich die typischen Labiaten-Drüsenköpfchen.

Bezüglich der pharmakologischen Wirkung von ätherischen Ölen berichtet die Literatur, daß einige bisher untersuchte Öle neben der allgemein bekannten lokalen Wirkung auf die äußere Haut, ihrer Wirkung auf die sensiblen Nervenendigungen, ihrer expectorierenden

78) CHERONIS, N.D.: "Semimicro and Macro Organic Chemistry", New York 1942, S. 167-170

und desinfizierenden Wirkung, auch eine thyreostatische Wirkung besitzen können⁷⁹⁾⁸⁰⁾⁸¹⁾.

Dieser zweite Punkt vor allem veranlaßte uns zu einer näheren Untersuchung der ätherischen Öle.

Zur Gewinnung des ätherischen Öles bedienten wir uns der Hydro-Destillation. Von den verschiedenen Apparaturen wählten wir den "Neo-Clevenger" nach O. MORITZ⁸²⁾ aus. Nach einigen vorausgegangenen Versuchen ließen wir bei dieser Apparatur einen kurzen Rückflußkühler am oberen Ende des Entlüftungs- und Druckausgleichsrohres anbringen, wodurch eine weitgehende quantitative Destillation gewährleistet wurde.

Wir erhielten 0,15 - 0,17 Vol.% eines hellgelben, herb-aromatisch riechenden ätherischen Öles. Das Stoffgemisch war optisch aktiv ($\alpha \frac{20^\circ}{D} = +6$ bis -3) mit einer Dichte von 0,975 und hatte einen Brechungsindex von $n \frac{22^\circ}{D} = 1,57$.

Die weitere Untersuchung des Ölgemisches erfolgte mit der von E. STAHL⁸³⁾ in Deutschland eingeführten und weiterentwickelten Dünnschicht-Chromatographie. Mit dieser Methode lassen sich in kürzester Zeit kleinste Mengen komplizierter Stoffgemische adsorptionschromatographisch auf Kieselgelschichten auftrennen. Die getrennten Komponenten können dann auf dieser "offenen Säule" mit aggressiven Sprühmitteln sichtbar gemacht werden.

Für die Bestimmungen verdünnten wir unser ätherisches Öl mit Chloroform 1:10; als Laufmittel diente reines Benzol.

Nach dem Besprühen mit Lösungen von Antimon-III-chlorid, Antimon-V-chlorid, Eisen-III-chlorid, Benzidin⁸⁴⁾ und 2,4-Dinitrophenylhydrazin⁸⁵⁾ konnten fünf voneinander getrennte Flecken erkannt werden (siehe Abb. 2 und 3, S. 21).

79) HAUSCHILD, F. in GILDEMEISTER/HOFFMANN "Die ätherischen Öle, Bd. I, S. 222, Berlin 1956

80) MÖLLER, H.: Arch.exp.Pathol.Pharmakol. 191, 615 (1939)

81) DOKLADY, C.T.R.: Akad.Wiss.UdSSR 30, 874 (1941)

82) MORITZ, O.: Arch.Pharmaz.Ber.dtsch.pharmaz.Ges. 276, 368 (1938)

83) STAHL, E.: Pharmazie 11, 633 (1956)

84) HORROCKS, R.H.: Nature (London) 164, 444 (1949)

85) IERSEN, A.L., P.H.MONAGHAN, C.A.RIVET, E.D.SMITH u. H.A.SUTER: Analytic.Chem. 22, 809 (1950)

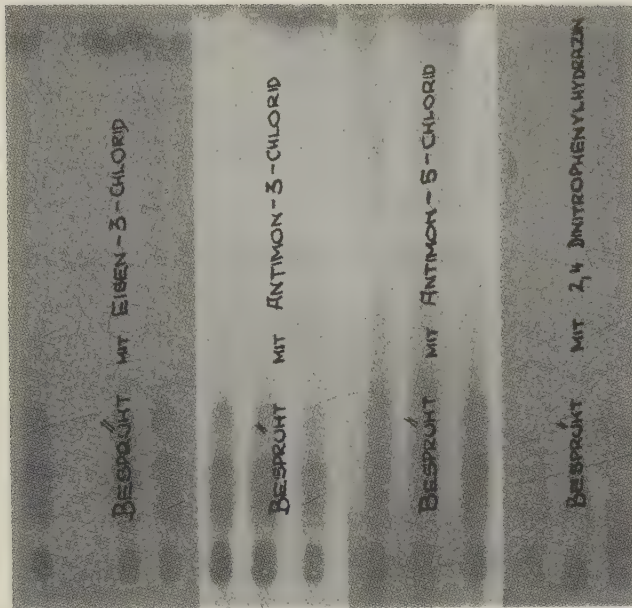


Abbildung 2

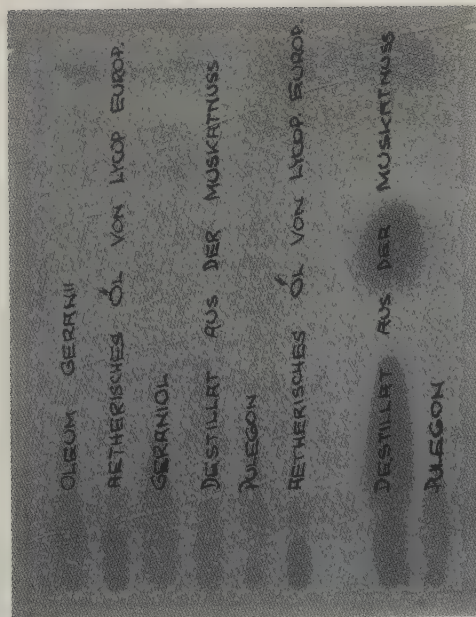


Abbildung 3

Von den mitgelaufenen Testsubstanzen bzw. Vergleichssubstanzen erwiesen sich Oleum Geranii bzw. Geraniol, sowie ein Destillat aus der Muskatnuß⁸⁶⁾, in den R_f -Werten sowie in den verschiedenen Farbreaktionen weitgehend ähnlich. Der Punkt mit dem R_f -Wert 0.23 - 0.25 könnte mit Pulegon identisch sein.

Bei verschiedenen Löslichkeitsversuchen kristallisierten beim Einengen einer Lösung des Öles in Pentan dünne feine Nadeln aus.

Eine weitere Untersuchung des Stoffgemisches dürfte die Arbeit späterer Untersuchungen sein.

b') Ursolsäure

Das regelmäßige Vorkommen von Ursolsäure, einer pentacyclischen Oxytriterpenkarbonsäure⁸⁷⁾, in verschiedenen bisher untersuchten Labiaten ist erwiesen. Innerhalb dieser Pflanzenfamilie, die sich durch ihren Reichtum an ätherischem Öl auszeichnet, konnten C. H. BRIESKORN, M. BRINER, L. SCHLUMPRECHT und K. H. EBERHARDT Zusammenhänge von Ursolsäure und ätherischem Öl feststellen⁸⁸⁾.

Ausgehend von einem Äthanolextrakt, erhielten wir nach dem Isolierungsgang von C. H. BRIESKORN und L. SCHLUMPRECHT⁸⁹⁾ eine schmutzig grünlichweiße Substanz. Diese "Rohursolsäure" wurde mit konzentrierter Schwefelsäure betupft, in der Kälte gelb, in der Wärme rot. Mit Chlorsulfonsäure trat eine violette Färbung, mit Thionylchlorid eine blaurote Färbung ein.

Nach einer Reinigung des Rohproduktes kristallisierten einzelne Nadeln aus, die einen Schmelzpunkt von 280 - 283° C hatten. Die aus Bärentraubenblättern dargestellte Ursolsäure⁸⁹⁾ hat einen Schmelzpunkt von 285° C.

Diese Ergebnisse entsprechen den Befunden, die C. H. BRIESKORN und L. SCHLUMPRECHT bei der Prüfung von Ursolsäure im Salbei gemacht haben.

86) LAY, B.: Dissertation, München (in Vorbereitung)

87) JEGER, O.: "Über die Konstitution der Triterpene" in L. ZECHMEISTER "Fortschritte d. Chemie org. Naturstoffe", Bd. VII, Wien 1950

88) BRIESKORN, C. H., BRINER, M., SCHLUMPRECHT, L. u. K. H. EBERHARDT: Arch. Pharmaz. Ber. dtsh. pharmaz. Ges. 285/57, 290 (1952)

89) BRIESKORN, C. H. u. L. SCHLUMPRECHT: Arch. Pharmaz. Ber. dtsh. pharmaz. Ges. 284/56, 239 (1951)

3. Veraschung und Bestimmung der Kationen und Anionen

Die Pflanzenasche interessierte besonders deshalb, weil H. SCHACH⁹⁰⁾, der Lycopusextrakte in Tierversuchen pharmakologisch untersucht hatte, auf das Vorhandensein von F l u o r hinwies.

Wir veraschten das Drogenmaterial nach der trockenen und nach der nassen Veraschungsmethode⁹¹⁾⁹²⁾. In beiden Fällen erhielten wir 8 - 10% P f l a n z e n a s c h e, die wir weiter zur Bestimmung der Kationen verwendeten. Nach einer vorausgegangenen analytischen Untersuchung nach G. JANDER und H. WENDT⁹³⁾ verwendeten wir für die papierchromatographische Untersuchung den kombinierten Trennungsgang nach E. BLASIUS und W. GÖTTLING⁹⁴⁾, der die verschiedenen Elemente in Gruppenchromatogrammen zusammenfaßt. Uns erschien auf Grund der vorangegangenen Analyse vor allem die Gruppe der Alkali und Erdalkali wichtig, ferner Eisen, Aluminium und Chrom.

Die ersteren Ionen chromatographierten wir als Azetate, d.h. in essigsäurer Lösung im System Äthanol/2n Essigsäure (80:20)⁹⁵⁾. Nach dem Trocknen wurde mit 0,1 m wässriger Violursäure besprüht und bei 60° C entwickelt. Es konnten in dieser Gruppe Natrium, Kalium, Calcium und Magnesium nachgewiesen werden.

Kalium	$R_f = 0.45$	rotviolett
Natrium	$R_f = 0.56$	violett
Calcium	$R_f = 0.68$	orange
Magnesium	$R_f = 0.76$	gelbrosa

Calcium und Magnesium wurden ferner mit einem Reagens nach F. FEIGL⁹⁶⁾ identifiziert. Mit Oxytriphenylmethanfarbstoffen bilden Calcium und Magnesium Farblacke. Nach dem Besprühen und anschließendem Bedampfen mit Ammoniak wurden zwei blaue bzw. violette Flecken sichtbar.

90) SCHACH, H.: Münchener med. Wschr. 97, 25, 824 (1955)

91) LINSKENS, H. F. "Papierchromatographie in der Botanik", Berlin-Göttingen-Heidelberg 1955, S. 44

92) KLEIN, G.: "Handbuch der Pflanzenanalyse", Bd. I, Wien 1931

93) JANDER, G. u. WENDT, H.: "Lehrbuch für das anorganisch-chemische Praktikum", Stuttgart 1949

94) BLASIUS, E. u. W. GÖTTLING, Diplomarb. W. GÖTTLING, T. U. Berlin 1957

95) ERLÉNMEIER, H., H. v. HAHN u. E. SORKIN: Helv. chim. Acta 34, 1419 (1957)

96) FEIGL, F.: Z. analyt. Chem. 152, 52 (1956)

Für die zweite Gruppe, die als Chloride aufgetragen wurde, diente Methanol/Eisessig (25:75) als Laufmittel. Eine Hälfte der Chromatogramme besprühten wir mit alkoholischer Alizarinlösung, während die andere Hälfte mit wässriger Natriumperoxydlösung und danach mit Benzidin/Eisessig behandelt wurde⁹⁷⁾. A l u m i - n i u m war in Spuren nachweisbar.

Für die A n i o n e n - Bestimmung verwendeten wir die Sodaschmelze der Droge. Hierfür waren für den Aufschluß ca. achtfache Mengen an Natriumkarbonat nötig⁹⁸⁾. Vor der Chromatographie wurde die stark alkalische Lösung zum Austausch der großen Kationenmenge mit Lewatit CNS 20^{*)}, einem Kationenaustauscher, behandelt. Als geeignetstes Lösungsmittel für die Halogene erwies sich Aceton/Wasser (80:20)⁹⁹⁾, für die weiteren Ionen Äthanol 95%ig/Ammoniak d=0.88/Wasser im Verhältnis 80:4:16¹⁰⁰⁾. Das in Streifen geschnittene Chromatogramm wurde nach dem Entwickeln mit spezifischen Sprühreagenzien behandelt¹⁰¹⁾, wobei wir mit Eisenrhodanidlösung F l u o r i d und mit Silbernitrat C h l o r i d nachweisen konnten. An weiteren Ionen waren noch P h o s p h a t und S u l f a t nachweisbar.

-
- 97) BURSTALL, F.H., G.R.DAVIES, R.P.LINSTEADT u. R.A.WELLS: J.chem.Soc.(London) 516 (1950)
98) LINSKENS, H.F.: "Papierchromatographie in der Botanik", Berlin-Göttingen-Heidelberg 1955, S. 45
99) LINSKENS, H.F.: "Papierchromatographie in der Botanik", Berlin-Göttingen-Heidelberg 1955, S. 48
100) LONG, A.G., R.J.QUAYLE u. R.J.STEDMAN: J.chem.Soc.(London) 2197 (1951)
101) LINSKENS, H.F.: "Papierchromatographie in der Botanik", Berlin-Göttingen-Heidelberg 1955, S. 51

*) Lewatit CNS 20 der Farbenfabriken Bayer, Leverkusen

4. Zusammenfassung

Die Gesamtanalyse von LYCOPUS EUROPAEUS L., die zunächst einer großen Übersicht dienen sollte, ergab folgende Inhaltsstoffe:

1) Organische Stoffe:

Zwei Flavonglykoside (Luteolin und Apigeninabkömmlinge), fünf aromatische Pflanzensäuren (Kaffee-, Chlorogen-, Sinapin-, Ellag- und Ursolsäure), Essigsäure als aliphatische Säure, sechs Aminosäuren (Tyrosin, Methionin, Threonin, Glutaminsäure, Asparaginsäure und Phenylalanin), Phosphorsäureester und Fettsäuren, freie Zucker, ätherisches Öl, Gerbstoff, Saponine und zuletzt noch Carotin.

2) Anorganische Stoffe:

An Kationen wurden Natrium, Kalium, Calcium, Magnesium und Aluminium und an Anionen Fluorid, Chlorid, Sulfat und Phosphat gefunden.

Aus dieser Vielzahl von Inhaltsstoffen griffen wir für die nähere Untersuchung einige Stoffgruppen heraus und zwar die beiden Flavonglykoside, das Fluor und die Kationen, ferner die Pflanzensäuren, die an unserem Institut bisher in einigen vorausgegangenen Veröffentlichungen und Dissertationen¹⁰²⁾¹⁰³⁾¹⁰⁴⁾ nur papierchromatographisch untersucht worden waren.

Die Aminosäuren, denen wegen einer eventuellen therapeutischen Wirkung eine bedeutende Rolle zukommen dürfte, sollen in einer späteren Arbeit näher untersucht werden.

102) HÜRHALMER, L. u. A. SCHEER: Arch. Pharmaz. Ber. dtsh. pharmaz. Ges. 288/60, 441 (1955)

103) MÜLLER, E.: Dissertation, München 1957

104) HÜRHALMER, L., H. WAGNER u. H. S. DHINGRA, Dtsch. Apotheker-Ztg. 98, 884 (1958)

III. Glykoside

1. Isolierung der Flavonglykoside

a) Herstellung eines wässerigen Extraktes

1 kg Droge wurde zunächst zur Abtrennung von Fettstoffen und Harzen mit PETROLÄTHER und danach zur weitgehenden Entfernung des Chlorophylls mit CHLOROFORM vorextrahiert. Anschließend folgte die eigentliche erschöpfende Extraktion mit METHANOL. Beim Erkalten des methanolischen Auszuges schieden sich weiterhin Pektin- und Schleimstoffe ab, die wir abfiltrierten. Den Rest des Chlorophylls brachten wir nach der "klassischen Methode" zur Abscheidung. Der erhaltene wässerige Extrakt wurde mit Natriumbikarbonat neutralisiert, um die vorhandenen Pflanzensäuren bei der Ausschüttelung mit organischen Lösungsmitteln möglichst im wässerigen Extrakt zurückzuhalten.

b) Ausschüttelungsversuche und Fällung mit Bleiazetat

Mit diesem vorgereinigten Auszug wurden Ausschüttelungsversuche mit verschiedenen organischen Lösungsmitteln und bei unterschiedlichem p_H -Wert durchgeführt. Für eines der beiden Glykoside konnten wir hierbei kein selektives Lösungsmittel finden. Bei den auf Grund des R_F -Wertes in Frage kommenden Lösungsmitteltypen blieben beide Flavonglykoside in der wässerigen Phase zurück, während sich lediglich Pflanzensäuren teilweise ausschütteln ließen. Mit BUTANOL allein gingen die Glykoside zusammen mit den Pflanzensäuren in die organische Phase über.

Bei der Fällung mit einer wässerigen Bleiazetatlösung - eine Methode, die heute noch häufig verwendet wird - fielen die Glykoside gemeinsam mit den Säuren aus¹⁰⁵⁾.

c) Säulenchromatographische Trennung

Da die klassischen Methoden der Ausschüttelung und die Fällung mit Bleiazetat zu keinem befriedigenden Ergebnis geführt

105) KLEIN, G.: "Handbuch der Pflanzenanalyse", Bd. I u. III/2, Wien 1931

hatten, wandten wir uns den modernen Verfahren der Säulenchromatographie zu.

In Anlehnung an Arbeiten von S. H. WENDER und Mitarbeitern¹⁰⁶⁻
110) gaben wir den wässerigen Extrakt zur weiteren Vorreinigung auf eine MAGNESOL-SÄULE, eluierten zuerst mit Wasser und anschließend mit Methanol. Der größte Teil der Kolloidstoffe, die vermutlich bei den Ausschüttelungen als Lösungsvermittler gewirkt haben, blieb dabei in der Säule haften, während die Glykoside und die Pflanzensäuren im Eluat erschienen.

Nach Abdestillieren des Methanols schüttelten wir das Eluat mit wassergesättigtem Butanol aus. Beim Einengen dieser Butanol-Ausschüttelung fiel ein gelbbrauner, krümeliger Bodensatz aus, der abzentrifugiert und verworfen wurde. Nach vollständigem Abdestillieren des Butanols nahmen wir den gelbbraunen, teils zähen Rückstand in heißem Wasser auf. Man erhielt eine gelbe, glykosidreiche Lösung, die zur Isolierung der Flavone geeignet erschien.

Nachdem sich die Verwendung von Polyamid neben der Reinigung auch zur Trennung von Flavonen schon mehrfach bewährt hatte¹¹¹⁻¹¹²⁾, gaben wir unsere wässrige Lösung auf eine PERLON-SÄULE. Die Säule wurde zunächst mit Wasser ausgewaschen, wobei in den wässerigen Fraktionen blau fluoreszierende Säuren erschienen, die bereits zum Teil untereinander aufgetrennt waren. Die beiden Glykoside, die sich im UV-Licht als breite braune Zone zu erkennen gaben, wanderten gleichfalls langsam nach unten. Sie wurden mit Methanol eluiert, und in den Fraktionen 3 bis 7 erhielten wir ein nahezu reines Gemisch der beiden Glykoside.

Die weitere Auftrennung versuchten wir über eine Zellulose-Säule¹¹³⁻¹¹⁵⁾. Als Eluationsmittel verwendeten wir wassergesättig-

106) WENDER, S.H., Th.B.GAGE u. C.H.ICE: Proc.Oklahoma Acad.Sci. 32, 99 (1951)

107) WENDER, S.H. u. C.H.ICE: Arch.Biochem.Biophysics 38, 185 (1952)

108) WENDER, S.H. u. C.H.ICE: Analytic.Chem. 24, 1616 (1952)

109) WENDER, S.H. u. B.WILLIAMS: J.Amer.chem.Soc. 59, 19 (1952)

110) WENDER, S.H. u. C.H.ICE: J.Amer.chem.Soc. 75, 50 (1953)

111) HÖRHAMMER, L., H.WAGNER u. W.LEEB: Naturwissenschaften 44, 513 (1957)

112) HÖRHAMMER, L., H.WAGNER, J.IZQUIERDO-SORLI u. H.ENDRES: Arch. Pharmaz.Ber.dtsch.pharmaz.Ges. 291, 269 (1958)

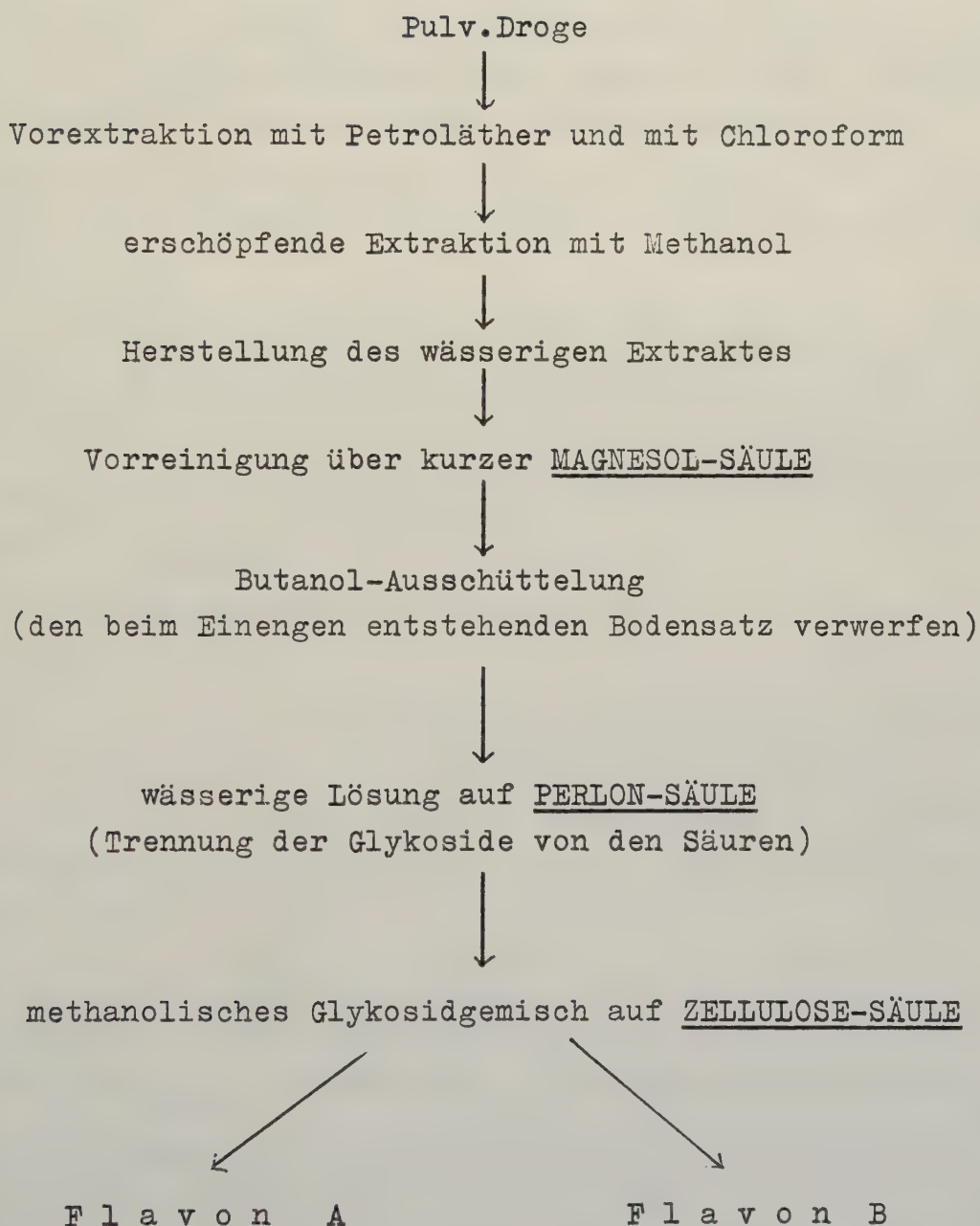
113) HÖRHAMMER, L., H.WAGNER u. F.GLOGGENGIEßER, ibid. 291, 126 (1958)

114) LEEB, W.: Dissertation, München 1958

115) WENDER, S.H., C.H.ICE u. Th.B.GAGE: Proc.Oklahoma Acad.Sci. 32, 99 (1951)

tes Äthylazetat. In den ersten fünf Fraktionen erschienen in Spuren noch die restlichen Pflanzensäuren, während die Fraktionen 6 und 7 Glykosid B und die Fraktionen 9 bis 14 Glykosid A enthielten.

Schematische Darstellung der Glykosidisolierung



2. Ermittlung der Konstitution von Glykosid A

a) Glykosidreaktionen

Glykosid A kristallisierte aus Äthanol/Wasser, dem etwa 3 Tropfen Azeton zugesetzt wurden, in Kohlensäureschnee aus. Die Ausbeute betrug 50 mg. Die hellgelbe, kristalline Substanz hatte einen Schmelzpunkt von 254-257° C (Kofler).

Der positive Ausfall des Tauböcktestes¹¹⁶⁾ und der Reduktionstests mit Zink bzw. Magnesium und Salzsäure nach R. WILLSTÄTTER und H. MALLISON¹¹⁷⁾ bestätigten den Flavoncharakter.

Die Ferrichloridreaktion nach T. R. SESHADRI¹¹⁸⁾ und Mitarbeitern mit der auftretenden dunkelgrünen Farbe zeigte eine freie C₅-OH-Gruppe an.

In Übereinstimmung mit dem Zirkon-Zitronensäure-Test mit nachfolgender Säurehydrolyse auf dem Papier¹¹⁹⁾ war Glykosid A am C₃ nicht oxydiert, so daß eine Zuckersubstitution am C₃ ausschied.

Das UV-Absorptionsspektrum von Glykosid A hatte die folgenden Maxima:

Maximum I	= 350 mμ
Maximum II	= 255 mμ

Zur weiteren Identifizierung wurde das IR-Spektrum herangezogen¹²⁰⁾. Es zeigte die für Flavone und Flavonole typische C=O Bande bei 1660 cm⁻¹, die C-O Valenzschwingungen der Zucker zwischen 1100 und 1000 cm⁻¹ und die für eine Di-Substitution im Seitenphenyl verantwortlichen Schwingungen bei 840 cm⁻¹ und 765 cm⁻¹ (siehe Abb. 4, S. 30).

116) TAUBÖCK, K.: Naturwissenschaften 30, 439 (1942)

117) WILLSTÄTTER, R. u. H. MALLISON: S.B.preuß.Akad.Wiss.physik.-math. Kl. 769 (1914)

118) ref.: BRIGGS, L.H. u. R.H. LOCKER: J.chem.Soc.(London) 3131 (1951)

119) HÖRHAMMER, L. u. K.H. MÜLLER: Arch.Pharmaz.Ber.dtsch.pharmaz.Ges. 287/59, 310 (1954)

120) HÖRHAMMER, L., H. WAGNER u. F. GLOGGENGIEßER: Arch.Pharmaz.Ber.dtsch.pharmaz.Ges. 291/63, 126 (1958)

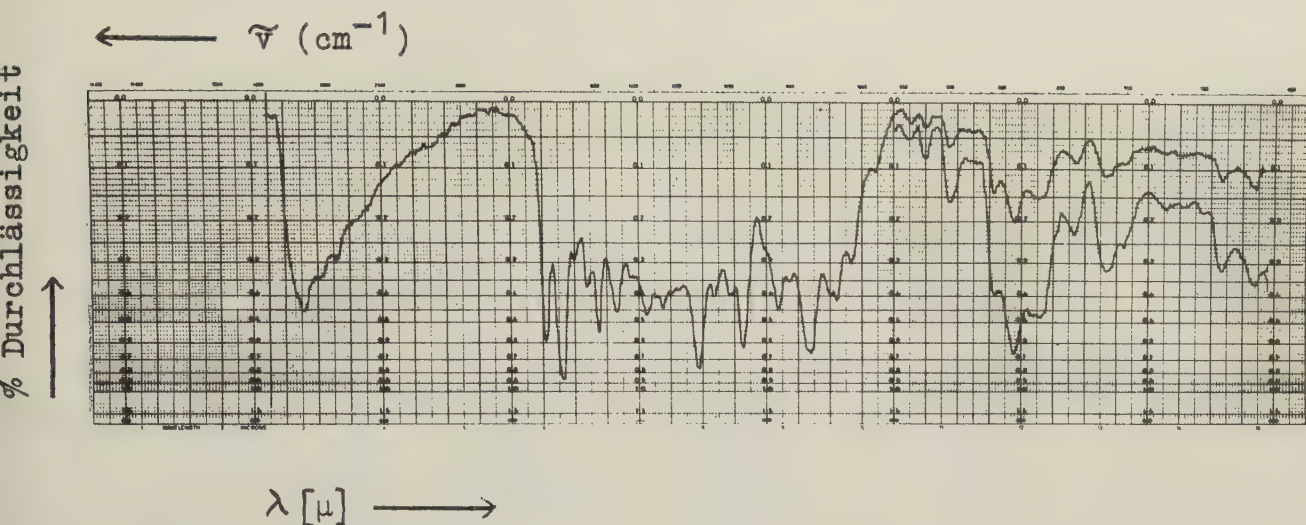


Abbildung 4

b) Identifizierung des Aglykons und der Zuckerkomponente

Nach einer 1/2stündigen Hydrolyse nach H. KILIANI¹²¹⁾ konnte papierchromatographisch nachgewiesen werden, daß eine vollständige Hydrolyse eingetreten war.

Die quantitative Hydrolyse ergab ein Monosid.

Das Aglykon hatte einen Schmelzpunkt von 323-325° C, das Acetylprodukt schmolz bei 225-227° C (Kofler).

Die Schmelzpunkte sowie der Vergleich der R_F -Werte in verschiedenen Lösungsmittelsystemen, als auch das UV-Absorptionsspektrum stimmten mit den authentischen Werten von Luteolin überein^{*)}.

T a b e l l e 2

	UV-Licht unbespr.	UV-Licht $AlCl_3$	UV-Licht Bleiazet.	UV-Spektr.	Schmelz- punkt	Acetyl- produkt
Aglykon A	dunkel	gelb	orange- ocker	I=350 mμ II=255 mμ	323- 325° C	225- 227° C
authentisch. Luteolin	dunkel	gelb	orange- ocker	I=351 mμ II=257 mμ	325° C	226- 227° C

Damit war für das Aglykon A die Identität mit Luteolin, einem 5,7,3',4'-Tetra-oxyflavon gegeben.

¹²¹⁾ KILIANI, H.: Ber.dtsch.chem.Ges. 63, 2866 (1936)

^{*)} Authentisches Luteolin wurde freundlicherweise von FrI.Dr.L. Endres, München, nachisoliert aus Digitalis purpurea nach H. NAKAMURA, J.pharmac.Soc.Japan 56, 107 (1936), überlassen.

Die Zuckerkomponente war nach Neutralisation der sauren Hydrolyselösung über Dowex 2^{*)} und Papierchromatographie in Pyridin/Äthylazetat/Wasser (1:2:2) identisch mit D - G l u c o s e . Der Schmelzpunkt F = 204-208° C stimmte mit authentischem Glucoseosazon überein, im Mischschmelzpunkt trat keine Depression auf.

Der Zuckeranteil von Glykosid A war D - G l u c o s e .

<u>CH-Bestimmung:</u>	C %	H %
ber.	56.25	4.47
gef.	54.89	4.55

Summenformel von Glucosid A : $C_{21}H_{20}O_{11}$

c) Versuche zur Klärung der Zuckerstellung

Die Verwendbarkeit einiger Diazoniumsalze zu Farbreaktionen untersuchte R. NEU¹²²⁾. Dabei bildeten alle von ihm bearbeiteten C-7-Glykoside mit den benützten Reagenzien keinerlei Farben, im Gegensatz zu Substanzen mit anderer Zuckerstellung. Mit einer Lösung von "Echtblausalz B" besprüht, erhielten wir folgende Ergebnisse:

T a b e l l e 3

Flavonglykosid	Zuckerstellung	Farbe
Glykosid A	unbekannt	farblos
Hesperidin	-C ₇ -	farblos
Luteolin-glucosid (Dr.Endres)	-C ₇ -	farblos
Kämpferol-3-galactosid	-C ₃ -	rotviolett
Rutin	-C ₃ -	rotviolett
Spiraeosid	-C ₄ '-	rotviolett

Nach diesen Farbtesten müßte Glykosid A an C₇ verglykosidiert sein.

122) NEU,R.: Chemiker-Ztg. 56, 991 (1932)

*) Dowex 2 der Fa. DOW, Chemical Co., Midland,Michigan U.S.A.

Zur weiteren Bestätigung dieser Annahme wurden verschiedene UV-spektrophotometrische Messungen vorgenommen.

- 1) Verschiedene Autoren¹²³⁻¹²⁶⁾ stellten fest, daß die Lage der Absorptionsmaxima von C₇-Glykosiden mit den der zugehörigen Aglykone übereinstimmen. Unser Glykosid A hatte dieselben Maxima wie das zugehörige Aglykon.
- 2) T. A. GEISSMAN und U. KRANEN-FIEDLER¹²⁷⁾ berichten, daß Glykoside mit freier C₇-Stellung und besetzter C₄-Stellung nach Natriumazetatzusatz eine starke bathochrome Verschiebung ihrer UV-Maxima erfahren, während bei C₇-Glykosiden mit freiem C₄ nur eine geringe bathochrome Verschiebung auftritt. L. HÖRHAMMER und Mitarbeiter¹²⁸⁾ fanden, daß die von obigen Autoren an Apigeninderivaten festgestellten Gesetzmäßigkeiten offensichtlich in ihrer Größenordnung nicht auf Luteolinglykoside übertragen werden können. Bei unserem Glykosid trat eine bathochrome Verschiebung um +25 mμ bei Maximum I und um + 6 mμ bei Maximum II auf.
- 3) Zur weiteren Bestätigung der C₇-Verglykosidierung und der freien ortho-Dioxygruppierung im Seitenphenyl arbeiteten wir nach den Versuchen von L. JURD¹²⁹⁾. Nach Borsäurezusatz erfuhr unser Glykosid eine bathochrome Verschiebung um +20 mμ (Max.I) und +5 mμ (Max.II).

Für die ortho-Dioxygruppierung im Seitenphenyl sprach auch die orange bis ockerfarbene Fluoreszenz im UV-Licht nach Besprühen mit basischem Bleiazetat¹³⁰⁾.

- 4) Die Messungen nach L. JURD und T. A. GEISSMAN¹³¹⁾ mit der starken bathochromen Verschiebung nach Zusatz von Aluminiumchlorid zeigten die freie 3',4'-Dioxygruppierung, die 5-OH-, sowie die

-
- 123) TASAKI, T.: J.chem.Soc.Japan 47, 299 (1926)
124) HATTORI, S.: Acta phytochim.(Tokyo) 4, 63 (1928)
125) MARCHLEWSKI, u. SKARZYNSKI, B.: Biochem.Z. 297, 56 (1938)
126) GEISSMAN, T.A. in PAECH:TRACEY "Moderne Methoden der Pflanzenanalyse", Berlin-Göttingen-Heidelberg 1956, Bd.III
127) GEISSMAN, T.A. u. U.KRANEN-FIEDLER: Naturwissenschaften 43, 226 (1956)
128) HÖRHAMMER, L., H.WAGNER u. F.GLOGGENGIEßER: Arch.Pharmaz.Ber. dtsh.pharmaz.Ges. 291/63, 1327 (1958)
129) JURD, L.: Arch.Biochem.Biophysics 63, 376 (1956)
130) KIRMAYER, W.: Dissertation, München 1959
131) JURD, L. u. GEISSMAN, T.A.: J.org.Chemistry 21, 1395 (1956)

C₄-Carbonylgruppe an. Glykosid A wies eine bathochrome Verschiebung um + 55 mμ bei Maximum I und um + 14 mμ bei Maximum II auf. Nach Zusatz von Natriumazetat kam es zu einer weiteren Verschiebung bei Max.I auf 78 mμ und bei Max.II auf 15 mμ. Nach den beiden Autoren kommt es hier offensichtlich zu einer Stabilisation der beiden möglichen Metallkomplexe.

T a b e l l e 4

	reines Äthanol		Äthanol +Na.az.		Äth.+Bors. +Na.az.		Äthanol +AlCl ₃		Äth.+AlCl ₃ +Na.az. ³	
	I	II	I	II	I	II	I	II	I	II
Glykosid A	mμ 350	mμ 255	mμ +15	mμ +6	mμ +20	mμ +5	mμ +55	mμ +14	mμ +78	mμ +15
Luteolin-4'-glucosid	334	270	+30	+7	+ 4	-1	+16	+ 3	+11	+ 4
Apigenin-4'-glucosid	328	276	+42	+4	+ 3	-1				

Auf Grund dieser Ergebnisse kann Glykosid A nur die Struktur eines L u t e o l i n - 7 - m o n o g l u c o s i d s zukommen.

3. Identifizierung von Glykosid B

Das nur in geringen Mengen in der Pflanze vorkommende Glykosid B gab einen positiven Reduktionstest, womit die Zugehörigkeit zur Gruppe der Anthoxanthine bewiesen war.

Die Ferrichloridreaktion und der Zitronensäuretest mit nachfolgender Säurehydrolyse ergaben ein Flavon mit freier C₅-Oxygruppe.

Nach salzsaurer Hydrolyse erwies sich das Aglykon sowohl papierchromatographisch als auch UV-spektrophotometrisch als A p i - g e n i n .

T a b e l l e 5

	P/A/W	B/E/W	Max.I	Max.II
Aglykon B	0.43	0.88	270 mμ	335 mμ
authent. Apigenin	0.42	0.88	269 mμ	336 mμ

Die Zuckerkomponente wurde papierchromatographisch und über den Schmelzpunkt des Osazons als D - G l u c o s e bestimmt.

Die quantitative Zuckerbestimmung wurde, da nur eine reine Glykosidlösung vorlag, nach R. DREYWOOD¹³²⁾ und nach L. HÖRHAMMER, E. VORNDRAN und H. WAGNER¹³³⁾ mittels der Anthronmethode durchgeführt. Das Verhältnis von Aglykon zu Zucker gleich 1:0,51 bzw. 1:0,49 charakterisiert Glykosid B als M o n o s i d .

Die Zuckerstellung am C₇-Kohlenstoffatom wurde an Hand der Verschiebungen an UV-Absorptionsspektren festgestellt. Der Echtblausalz-Test bestätigte die Meßergebnisse.

T a b e l l e 6

Methanol	Verschiebung m. Na-azetat	Verschiebung m. Borsäure	Verschiebung m. AlCl ₃ ^{*)}	AlCl ₃ ^{*)} Na-azetat
Max. I 335 mμ	+ 15 mμ	+ 6 mμ	+ 42 mμ	+ 40 mμ
Max. II 268 mμ	+ 7 mμ	- 1 mμ	+ 9 mμ	+ 9 mμ

Damit ist Glykosid B identisch mit A p i g e n i n - 7 - m o n o g l u c o s i d .

IV. Pflanzensäuren

1. Zusammenfassende papierchromatographische Untersuchung von KAFFEE-, CHLOROGEN- und SINAPINSÄURE

Zum Nachweis auf dem Papierchromatogramm stehen uns eine Reihe brauchbarer Reaktionen¹³⁴⁾ zur Verfügung, die allerdings in vielen Fällen nicht allein für eine der drei Säuren spezifisch sind, sondern auch bei anderen Oxyzimtsäurederivaten bzw. 1,2-Dioxy-benzol-derivaten oder mehrwertigen Phenolen auftreten können. Als gutes

132) DREYWOOD, R.: Ind. Engn. Chem. analyt. Edit. 18, 499 (1946)

133) HÖRHAMMER, L., E. VORNDRAN u. H. WAGNER: Arch. Pharmaz. Ber. dtsch. pharmaz. Ges. 289/61, 316 (1956)

134) HERRMANN, K.: Pharmaz. Zentralhalle Deutschland 95, 56 (1956)

*) Bei der Verschiebung mit Aluminiumchlorid traten bei 342 mμ und 303 mμ zwei weitere Maxima auf.

Charakteristikum dieser Säuren gilt, daß sich ihre R_f -Werte in Zwei- bzw. Dreikomponentensystemen umkehren.

Zur weiteren Bestätigung können die UV-Spektren aus den Papiereluataten herangezogen werden. Es sind schon Verfahren bekannt, welche die Messung unmittelbar auf dem Papier gestatten¹³⁵⁾.

Bei unseren Untersuchungen verwendeten wir folgende Lösungsmittel:

- 1) Butanol/Essigsäure/Wasser¹³⁶⁾ (4:1:5)
- 2) Butanol/Ameisensäure/Wasser¹³⁷⁾ (4:1:5)
- 3) Essigester/Ameisensäure/Wasser¹³⁸⁾ (10:2:3)
- 4) Toluol/Essigsäure/Wasser¹³⁹⁾ (4:1:5)
- 5) 15%ige Essigsäure¹³⁶⁾

Von diesen Laufmitteln erwies sich für die Trennung von Kaffeesäure und Chlorogensäure 15%ige Essigsäure am geeignetsten. Schwierigkeiten bereitete die Trennung von Sinapinsäure und Kaffeesäure. Hier gestattete die obere Phase eines Gemisches von Toluol/Essigsäure/Wasser eine einwandfreie Trennung und eine sichere Unterscheidung. Zur Auswertung der Flecken auf dem Papierchromatogramm zogen wir folgende qualitative Nachweisreaktionen heran, deren Ergebnisse in Tabelle 7 (siehe S. 37) aufgeführt sind.

- 1) Beobachtung der Fluoreszenz im ultravioletten Licht¹⁴⁰⁾.
- 2) Beobachtung der Fluoreszenz nach Bedampfen mit Ammoniak¹⁴¹⁾.
- 3) Besprühen mit Diazo-benzolsulfonsäurelösung. Vor dem Besprühen wurde Lösung I (= 0,5%ige wässrige Kaliumnitritlösung) mit Lösung II (= 0,5%ige Sulfanilsäure in n/1 Salzsäure) zu gleichen Teilen gemischt¹⁴²⁾.
- 4) Besprühen mit diazotiertem p-Anilin¹⁴³⁾.

135) BRADFIELD, A.E. u. A.E.FLOOD: J.chem.Soc.(London) 4740 (1952)

136) HERRMANN, K.: Pharmaz.Zentralhalle Deutschland 95, 56 (1956)

137) PAECH, K. u. H.RUCKENBROD: Ber.dtsch.bot.Ges. 66, 75 (1953)

138) SVENDSEN, A.B.: Pharmac.Acta Helvetiae 26, 253 (1951)

139) BATE-SMITH, E.C.: Sci.Proc.Roy.Dublin Soc. 27, 165 (1956)

140) HERRMANN, K.: Pharmazie 11, 435 (1956)

141) HERRMANN, K.: Naturwissenschaften 45, 111 (1958)

142) EVANS, R.A., W.C.EVANS u. W.H.PARR: Nature (London) 164, 674 (1949)

143) GRIFFITHS, L.A.: Nature (London) 180, 286 (1957)

- 5) Besprühen mit einer Lösung von 1 g Natriumnitrit in 2,5%iger methanolischer Essigsäure. Nach dem Trocknen sollte weiter mit 0,5%iger methanolischer NaOH besprüht werden. Wir fanden 2%ige wässrige KOH geeigneter¹⁴⁴⁾.
- 6) Besprühen mit einem Gemisch gleicher Teile 2%iger Silbernitratlösung und 10%iger Ammoniakflüssigkeit¹⁴⁵⁾.
- 7) Besprühen mit Phosphorwolframsäure (Folin-Reagens)¹⁴⁶⁾ und nach dem Trocknen an der Luft mit 0,5 n methanolischer Natronlauge.
- 8) Besprühen mit 2%iger wässriger Phosphormolybdänsäurelösung, anschließend mit NH_3 -Dämpfen behandeln¹⁴⁷⁾.
- 9) Besprühen mit 2%iger wässriger Eisenchlorid-III-Lösung¹⁴⁵⁾.
- 10) Besprühen mit 2%iger wässriger KOH.
- 11) Besprühen mit einer Lösung von basischem Bleiazetat.

Durch Vergleich der erhaltenen Ergebnisse mit den Literaturangaben, konnten die drei Säuren in LYCOPUS EUROPAEUS papierchromatographisch nachgewiesen werden. Eine anschließende Isolierung von Kaffee- und Chlorogensäure bestätigte die Resultate der Papierchromatographie. Sinapinsäure verglichen wir mit Auszügen von THALLICTRUM MINUS L., VICIA SATIVA L. und SCROPHULARIA VERNALIS L., die nach E. C. BATE-SMITH¹⁴⁸⁾ Sinapinsäure enthalten.

144) HERRMANN, K.: Pharmazie 13, 271 (1958)

145) BATE-SMITH, E.C. u. R.G.WESTALL: Biochim.biophysica Acta (Amsterdam) 4, 427 (1950)

146) FOLIN u. DENIS in E.Merck, Reagenzien-Verzeichnis (Darmstadt 1929), S. 185

147) RILEY, R.F.: J.Amer.chem.Soc. 42, 5782 (1950)

148) BATE-SMITH, E.C.: Chem.and Ind. 1457 (1954)

T a b e l l e 7

	Kaffeensäure	Chlorogensäure	Sinapinsäure
1. R_F -Wert B/E/W	0.82	0.66	0.83
2. R_F -Wert B/A/W	0.84	0.75	0.85
3. R_F -Wert Ä/A/W	0.85	0.60	0.828
4. R_F -Wert T/E/W	0.00	0.00	0.12
5. R_F -Wert 15% E.	0.45	0.71	0.49
1. Fluoreszenz im UV-Licht	leuchtend hellblau	schwach hellblau	blau
2. Fluoreszenz im UV-Licht nach NH_3 -Dämpfen	weitere Verstärkung der hellbl. Fluoresz.	grüngelb	blaugrün
3. Diazo-Reagens	hellbraun bis fleischfarben	gelbbraun bis fleischfarben	blauviolett
4. Diazotiertes p-Anilin	rotbraun	braun	-
5. Natriumnitrit-Essigs.-Reagens	rötlich bis rotbraun	gelbbraun	rehbraun bis schw.gelbbrr.
6. Ammoniakalische Silbernitratlsg.	mausgrau	braungrau	braungrau, etw gelblich
7. Folin-Reagens	schwach gelblich	schwach gelblich	keine Reaktion
8. Phosphormolybdänlösung	blau	grau	gelblich
9. Eisen-III-chloridlösung	grau bis graugrün	grau bis graugrün	grau bis graugrün
10. wässrige KOH	grünlich blau fluoreszierend	sehr schwach blau fluoresz.	blau fluoreszierend
11. basisches Bleiazetat	gelb (leuchtend)	gelblich grün	schmutzig grüngelb
12. Bromphenolblau-Indikator	schwach gelb	schwach gelb	schwach gelb

Papierchromatographischer Nachweis von Ellagsäure

Bei einer späteren nochmaligen Überprüfung des methanolischen Extraktes befaßten wir uns näher mit einem schon früher beobachteten schwach fluoreszierenden Fleck.

Der Stoff hatte in Butanol/Eisessig/Wasser einen R_f -Wert von 0.18 bis 0.21, in Ä/A/W einen R_f -Wert von 0.242 und fluoreszierte im UV-Licht zart violett. In Säure-hydrolysierten Blattextrakten trat der Fleck gleichfalls auf. Da wir laut Literaturangaben auf Grund des tiefen R_f -wertes Ellagsäure vermuteten, chromatographierten wir nach E. C. BATE-SMITH¹⁴⁹⁾ im "Forestal"-Lösungsmittelgemisch (Eisessig/konz.HCl/Wasser, 10:1:3). Die Säure hatte hier einen R_f -Wert von 0.33, der genau mit den Angaben von E. C. BATE-SMITH übereinstimmt. Mit Ammoniak-Dämpfen trat im UV-Licht, wie auch im Tageslicht eine blaßgelbe Färbung auf. Nach Besprühen mit 1%iger Natriumnitritlösung in verdünnter Essigsäure zeigte sich zunächst eine gelbbraune Farbe, die später dann schmutzig bis schwarzbraun wurde. Auch diese Farbreaktionen stimmten mit den Nachweismethoden von E. C. BATE-SMITH überein.

Ein späterer Vergleich mit authentischer Ellagsäure der Fa. Roth, Karlsruhe, bestätigte die Untersuchungsergebnisse.

Damit war E l l a g s ä u r e papierchromatographisch nachgewiesen.

2. Isolierung von Kaffee- und Chlorogensäure

Ausgehend von 2 kg Droge wurde nach erfolgter Äthanol-extraktion in ähnlicher Weise wie bei der Glykosidisolierung ein wässriger Extrakt hergestellt. Dieser wurde in heißem Wasser aufgenommen, filtriert und auf einen p_H -Wert von etwa 5,0 eingestellt.

Dieses Filtrat schüttelten wir zuerst mit Äther und darauf mit Essigester aus, wobei der Äther im wesentlichen K a f f e e - s ä u r e und der Essigester die C h l o r o g e n - und

149) BATE-SMITH, E.C.: Chem. and Ind. 32, (1956); ref. Chem.Zbl. 129, 6864 (1958)

Sinapinsäure enthielt. Die Lösungsmittel wurden abdestilliert und die Rückstände in Methanol aufgenommen.

Die weitere Trennung der Säuren von Begleitstoffen, sowie der Säuren untereinander, wurde mittels Säulenchromatographie an PERLON vorgenommen. Da Kristallisationsversuche an weitgehend reinen Kaffee- und Chlorogensäurelösungen fehlschlagen, unterzogen wir diese Fraktionen noch einer Reinigung an der CRAIG-VERTEILUNG.

Kaffeesäure: Wir gaben die Lösung I (= angereicherte methanolische Kaffeesäurelösung) auf eine etwa 50 cm hohe und 4 cm weite Perlonsäule und entwickelten mit 2%iger Essigsäure. Unter dem UV-Licht verfolgten wir die Wanderung einer schmalen und einer breiten, blau fluoreszierenden Zone. Ihr Abstand war jedoch nicht allzu groß, so daß zur schärferen Trennung die Fraktionen unter Einwirkung von Ammoniak-Dämpfen aufgefangen wurden. Die voranlaufenden Chlorogen- und Sinapinsäuren (schmale Zone) fluoreszierten blaugrün bis gelbgrün, während Kaffeesäure (breite Zone) eine deutlich zu unterscheidende hellblaue Fluoreszenz aufwies. Wir erhielten eine chromatographisch reine Fraktion von Kaffeesäure.

Durch Craig-Verteilung dieser Fraktion mit 0,5 mol. Phosphatpuffer p_H 6.0 als untere und Äther/Essigester (5:1) bzw. (5:2) als obere Phase bekamen wir eine vollkommen reine Kaffeesäurelösung. Der Verteilungskoeffizient V_K betrug 0,43.

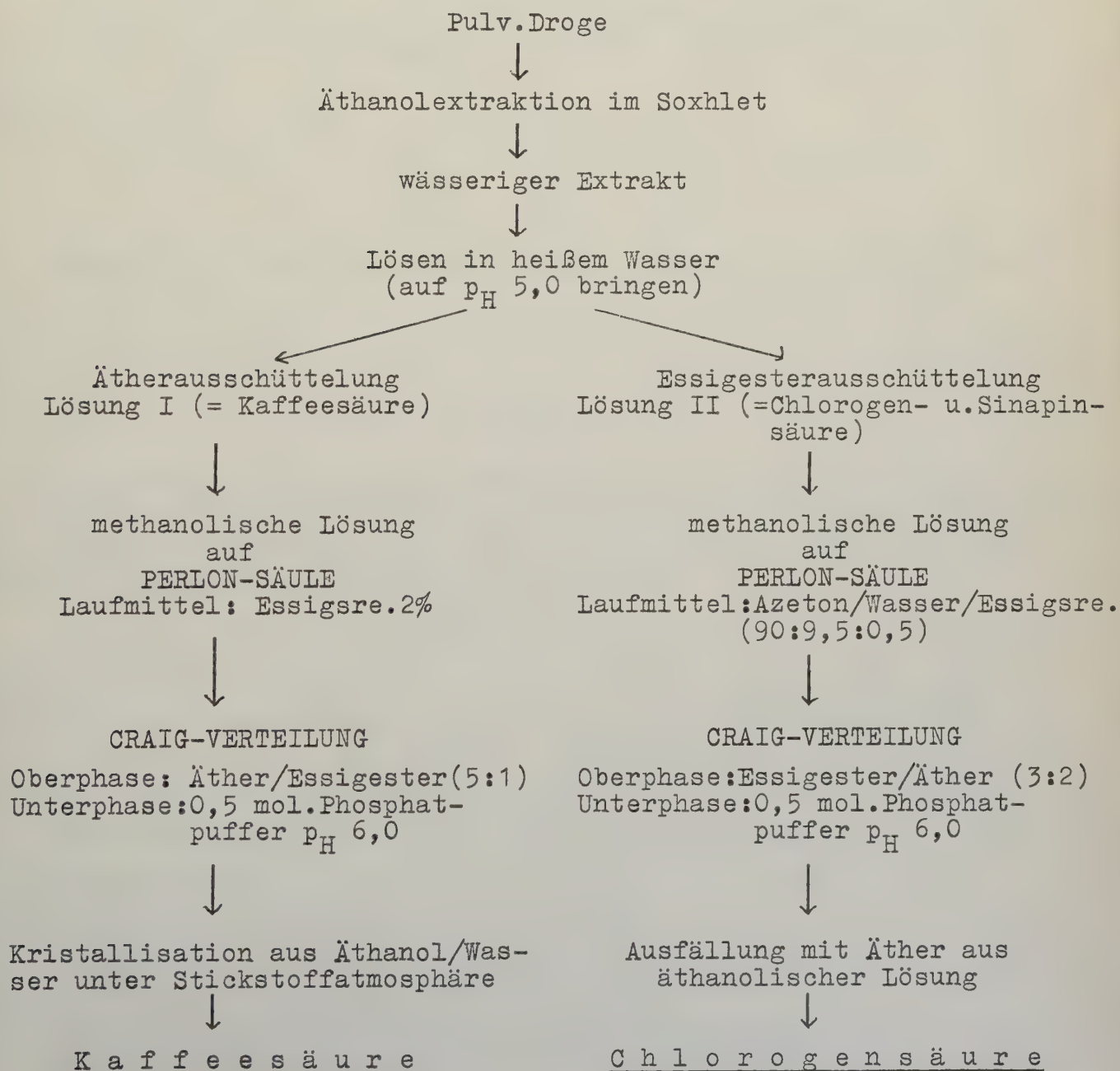
Aus Äthanol/Wasser kristallisierten bei starker Unterkühlung in Stickstoffatmosphäre 50 mg Kaffeesäure aus.

Chlorogensäure: In ähnlicher Weise wurde auch Lösung II (= Chlorogen- und Sinapinsäure) auf eine Perlonsäule gegeben. In diesem Falle eluierten wir mit einem Gemisch von Azeton/Wasser/Essigsäure (90:9:5:0,5). Die Fraktionen 3 bis 5 enthielten papierchromatographisch reine Chlorogensäure, während die nächsten Fraktionen ein Gemisch von Chlorogen- und Sinapinsäure und teils auch noch Kaffeesäure enthielten. Die weiteren Begleitstoffe der Essigesterausschüttelung, z. B. geringe Mengen von Glykosid A, blieben in der Säule haften, bzw. erschienen erst in späteren Fraktionen. Die reinen chlorogensäurehaltigen Lösungen wurden im Vakuum

bei niederer Temperatur abdestilliert und der Rückstand mit der Gegenstromverteilung nochmals gereinigt.

Als obere Phase diente Essigester/Äther (3:2), als Unterphase wie vorhin Phosphatpuffer p_H 6,0. Der Verteilungskoeffizient war 2,10. Chlorogensäure ließ sich dann aus äthanolischer Lösung mit Äther fällen. Wir erhielten 90 mg kristalliner Chlorogensäure.

Schematische Darstellung der Säureisolierung



3. Identifizierung von Kaffee- und Chlorogensäure

a) Kaffeensäure

Die gelblichen Nadeln schmolzen bei 195-198° C (Kofler). Die Literaturangaben über den Schmelzpunkt schwanken zwischen 195° und 225° C ¹⁵⁰⁾. Die Schmelzpunktsdifferenzen werden von einzelnen Autoren ¹⁵¹⁻¹⁵³⁾ auf das Vorliegen eines Gemisches isomerer Formen zurückgeführt. In den meisten Fällen wurde jedoch der Schmelzpunkt bei 195-198° C gefunden.

Durch Titration mit n/10 Lauge wurde das Molekulargewicht des isolierten Stoffes zu 178 bestimmt. Kaffeensäure hat ein Molekulargewicht von 180.

Die CH-Bestimmung ergab:	C%	H%
ber.:	60,00	4,44
gef.:	59,74	4,56.

Das UV-Spektrum, aufgenommen in methanolischer Lösung, zeigte bei 324 mμ ein ausgeprägtes Maximum. Ferner traten zwei weitere Maxima bei 245 und 299 mμ auf. Diese Ergebnisse entsprechen den Literaturangaben ¹⁵⁴⁾. Nach Natriumazetatzusatz wurden die Absorptionsmaxima nach der kürzeren Wellenlänge um 8mμ verschoben.

Bei den Messungen war zu beachten, daß die alkoholischen Lösungen bald gemessen wurden. Die Oxyzimtsäuren verestern leicht, so daß Lösungen dieser Säuren in schwach angesäuertem Alkohol schon nach wenigen Tagen Ester geben. Dies trat auch ein, wenn saure Lösungen mit Essigester extrahiert wurden ¹⁵⁵⁾.

Das IR-Spektrum war identisch mit dem von authentischer Kaffeensäure (siehe Abb. 3 und 4, S. 42). Es zeigte zwischen 3000 und 3400 cm⁻¹ die für OH-Valenzschwingungen verantwortlichen Banden und bei 1660 cm⁻¹ die C=O Bande der Carboxylgruppe. Ein Teil der bei 850, 805, 780 und vor allem ausgeprägt bei 820 cm⁻¹ auftretenden Banden mittlerer Intensität dürften γ-Schwingungen sein, wie

-
- 150) HERRMANN, K.: Pharmazie 11, 434 (1956)
151) PLETICHA, R.: Pharmazie 8, 987 (1953)
152) MATSUMOTO, K.: J. pharmac. Soc. Japan 73, 1375 (1953)
153) FIEDLER, U.: Arzneimittel-Forsch. 4, 41 (1954)
154) HERRMANN, K.: Pharmazie 13, 270 (1957)
155) WILLIAMS, A. H.: "Colloquium on Hydroxy-aromatic Acids", Cambridge 1956, ref.: Chem. and Ind. 478 (1956)

sie H. DANNENBERG für mono-, di-, tri- und tetrasubstituierte Benzoldarivate¹⁵⁶⁾ diskutiert hat.

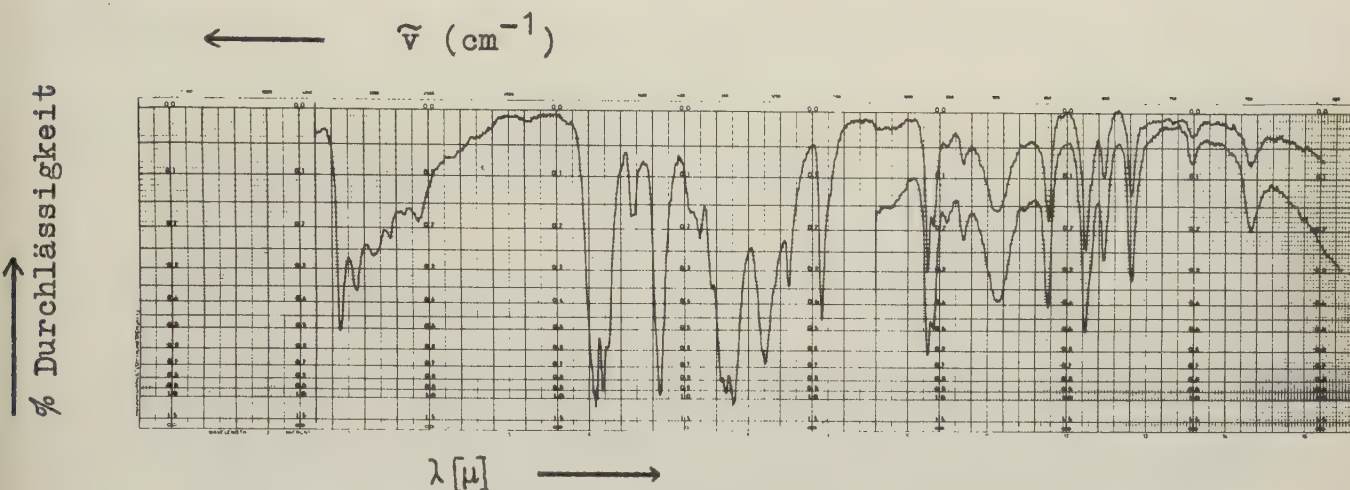


Abbildung 5
IR-Spektrum von Kaffeesäure aus *Lycopodium europaeus*

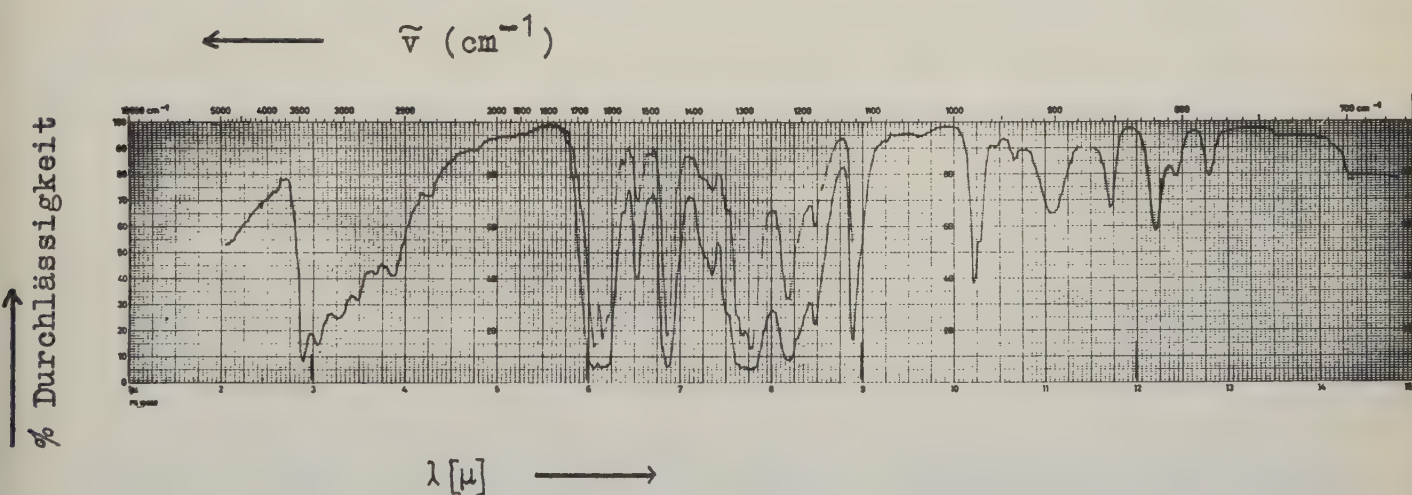


Abbildung 6
IR-Spektrum von Kaffeesäure authentisch

Der isolierte Stoff ist also K a f f e e s ä u r e .

156) DANNENBERG, H., U. SCHIEDT u. W. STEIDLE, Z. Naturforsch. 86, 269 (1953)

b) Chlorogensäure

Die isolierte weiße Substanz hatte einen Schmelzpunkt von 207-208° C, was den Literaturangaben für Chlorogensäure entspricht¹⁵⁷

Das Molekulargewicht ergab 351 gegenüber 354 des tatsächlichen Wertes.

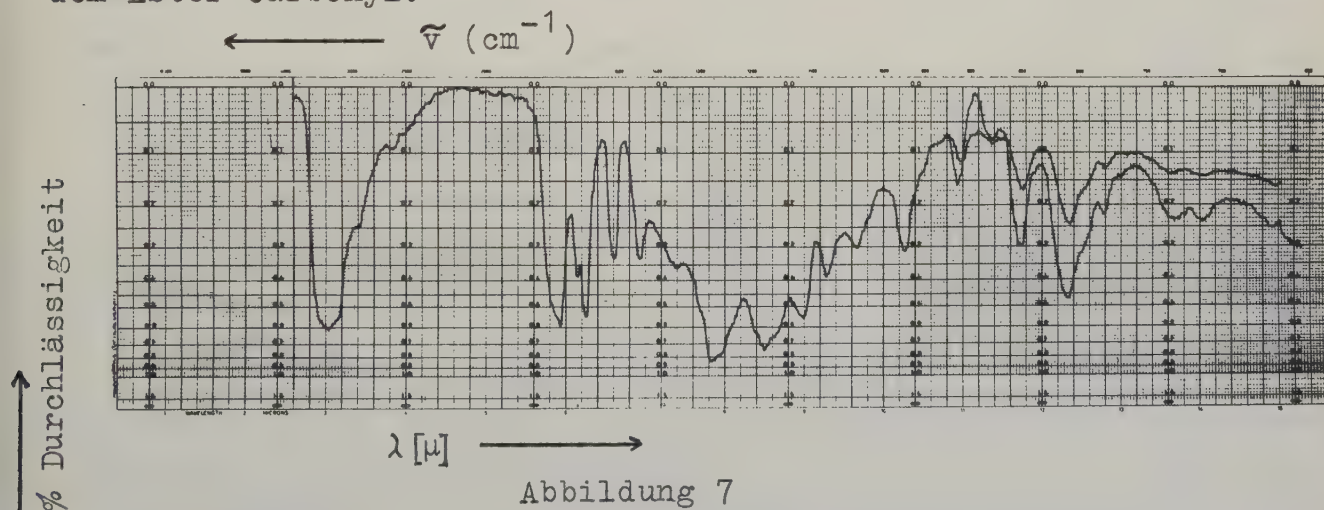
Die CH-Bestimmung lieferte folgende Werte:

	C%	H%
ber.:	54,20	5,05
gef.:	52,98	5,20.

Das UV-Absorptionsspektrum in Methanol zeigte ein ausgeprägtes Maximum bei 323 m μ neben einem kleineren Maximum bei 245 m μ . Nach Zusatz von Natriumazetat wurde Maximum I nach der längeren Wellenlänge um +12m μ verschoben, was den Angaben nach L. JURD¹⁵⁸⁾ entspricht.

Nach einstündiger Hydrolyse mit 2%iger Salzsäure konnten K a f f e e s ä u r e und das zweite Hydrolyseprodukt C h i n a - s ä u r e papierchromatographisch durch Besprühen mit Hydroxyl-phenyl-benzo-pyron nach R. NEU¹⁵⁹⁾ nachgewiesen werden. In B/E/W wurde bei einem R_F-Wert von 0,186 und in B/A/W bei einem R_F-Wert von 0,199 ein rotvioletter Fleck sichtbar.

Das IR-Spektrum ist, außer durch die schon bei der Kaffeesäure diskutierten Banden, namentlich durch die breite Absorptionsbande bei 1700 cm⁻¹ charakterisiert. Sie entspricht lagemäßig dem Ester-Carboxyl.



IR-Spektrum von Chlorogensäure aus *Lycopodium europaeus*

157) KARRER, W.: "Konstitution und Vorkommen der organischen Pflanzenstoffe", Basel-Stuttgart 1958, S. 395

158) JURD, L.: Arch. Biochem. Biophysics 66, 284 (1957)

159) NEU, R.: Naturwissenschaften 12, 286 (1958)

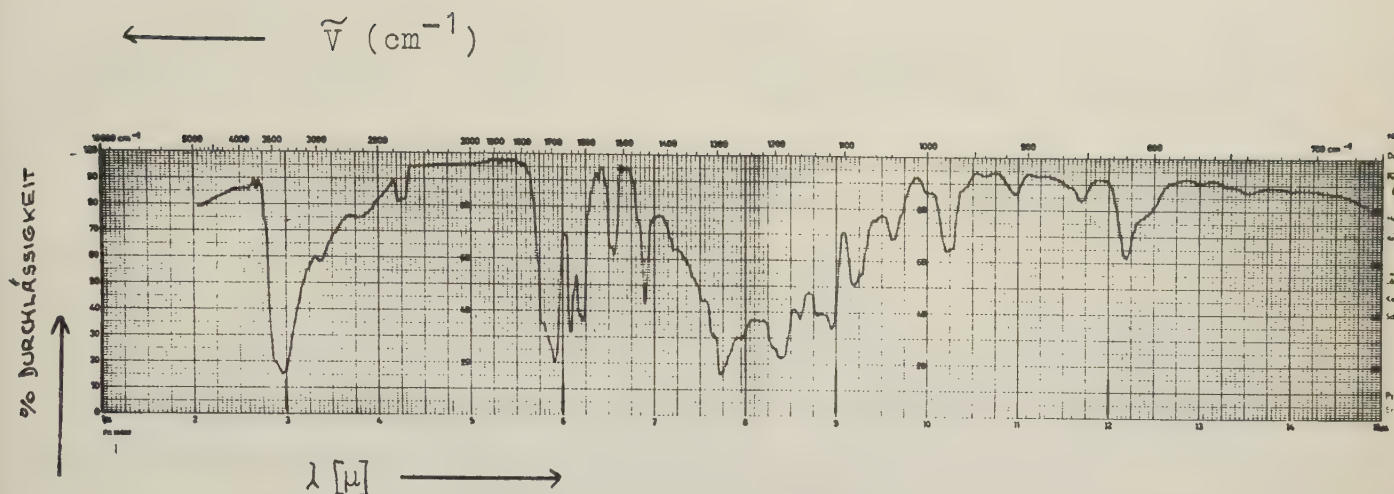


Abbildung 8
IR-Spektrum von Chlorogensäure, authentisch

Die isolierte Substanz ist Chlorogensäure.

V. Pflanzenasche

1. Qualitative und quantitative Fluorbestimmung in der Droge

In schwierigen Fällen gilt heute als genauestes und am vielseitigsten anwendbares Verfahren zur Fluor-Bestimmung die Methode nach H. H. WILLARD und O. B. WINTER¹⁶⁰⁾. Danach wird das Fluor bei Gegenwart von Kieselsäure aus stark saurer Lösung als H_2SiF_6 abdestilliert und kann dann in der Vorlage auf verschiedene Weise maßanalytisch oder gravimetrisch bestimmt werden.

Ein Nachteil dieses sonst sehr eleganten Verfahrens ist darin zu sehen, daß die Destillation, die bis zu 2 Stunden dauern kann, einer ständigen Überwachung bedarf, da durch Regelung der Wasserezugabe eine bestimmte Säurekonzentration eingehalten werden muß.

Es ist erklärlich, daß deshalb im Laufe der Jahre von den verschiedensten Seiten¹⁶¹⁾ apparative Verbesserungen dieser Methode

160) WILLARD, H. H. u. O. B. WINTER: Ind. Engn. Chem., analyt. Edit. 5, 7 (1933)

161) FRESENIUS, W. u. G. JANDER: "Handbuch der analytischen Chemie", Teil III, Bd. 7a, S. 179 ff, Berlin 1950

vorgeschlagen wurden. Durch das Prinzip, das Wasser im Kreislauf zu führen, lösten G. PIETZKA und P. EHRLICH¹⁶²⁾ das Problem der unbeaufsichtigten Destillation.

Bei unseren Untersuchungen verwendeten wir die von obigen Autoren beschriebene Apparatur.

Für die einzelnen Bestimmungen veraschten wir jeweils 100 g getrocknete Droge vorsichtig im Glühofen. Die Destillation erfolgte dann unter genau einzuhaltenden Bedingungen entweder aus schwefelsaurer oder aus phosphorsaurer Lösung.

In der Vorlage wurde zunächst ein qualitativer Nachweis mit Eriochromcyanin R und mit Alizarin S durchgeführt. Die dunkelrote Färbung, die bei Einwirkung von Zirkonsalzlösungen auf Alizarin S auftritt¹⁶³⁾, verschwindet bei Zufügen von Fluoriden. Gleichfalls wird der rotviolette Farblack, den Eriochromcyanin R mit Aluminiumsalzen bildet, durch Fluor-Ionen entfärbt¹⁶⁴⁾.

Quantitativ wurde eine maßenanalytische und eine gravimetrische Bestimmung vorgenommen. Von den direkten Verfahren ist zweifellos die Titration mit n/100 Thoriumnitratlösung die wichtigste. In Abänderung titrierten wir nicht mit Alizarinfarblack als Indikator, sondern nach E. KÖRÖS¹⁶⁵⁾ mit Brenzkatechinviolett von gelbgrün nach blau. Die höher erhaltenen maßenanalytischen Werte dürfen auf dem Übergehen von Spuren der Schwefel- bzw. Phosphorsäure in den Dampf beruhen.

Übereinstimmende Werte erhielten wir durch eine direkte mikrogravimetrische Bestimmung nach H. BALCZO und H. SCHIFFNER¹⁶⁶⁾. Mit Hilfe dieses neuen Fällungsverfahrens, der Zweiphasenfällung, ist es möglich, Fluormengen zwischen 10 und 150 γ auch neben Phosphat- und Borat-Ionen sowie neben Aluminium und Eisen mit genügender Genauigkeit gravimetrisch direkt zu bestimmen. Wir fanden dabei, daß die Untersuchungslösung am besten auf einen p_H -Wert von 7 gebracht werden soll.

162) PIETZKA, G. u. P. EHRLICH: Angew. Chem. 65, 131 (1953)

163) GERICHKE, S. u. B. KURMIES: Z. analyt. Chem. 132, 335 (1951)

164) RICHTER, F.: Chem. Techn. 1, 84 (1949)

165) KÖRÖS, E.: Acta pharmac. hung. 27, 10 (1957)

166) BALCZO, H. u. H. SCHIFFNER: Mikrochim. Acta 1829 (1956)

Aus maßanalytischen und gravimetrischen Bestimmungen konnten wir einen Fluorgehalt von 0,04 - 0,1% errechnen.

2. Polarographische Bestimmung von Na, K und Ca

Seit der Entwicklung der Polarographie durch J. HEYROVSKY¹⁶⁷⁾ hat diese physikalisch-chemische Methode in der qualitativen,¹⁶⁸⁾ wie in der quantitativen Analyse zusehends an Bedeutung gewonnen. Ihr großer Vorteil beruht darin, daß mit minimalen Mengen gearbeitet werden kann. Es können alle reduzierbaren organischen und anorganischen Stoffe bestimmt werden, wobei der Kurvenanstieg die Qualität und die Kurvenhöhe die Quantität anzeigt.

J. HEYROVSKY bezeichnet das Polarogramm als elektro-chemisches Spektrum der Lösung. Im optischen Spektrum sind die einzelnen Spektrallinien nebeneinander angeordnet. Beim Polarogramm kann die Größe der einzelnen Stufen bei verschiedenen Spannungen abgelesen werden.

In der anorganischen Chemie können die meisten Kationen und auch eine große Anzahl von Anionen bestimmt werden.

Für die Untersuchungen veraschten wir gewogene Mengen pulverisierter Droge nach der nassen Methode¹⁶⁹⁾. Für die Bestimmung von Na, K und Ca mußten die filtrierten Pflanzenaschelösungen nitratfrei sein. Ferner mußte vorher eine Trennung der Alkalien von den Erdalkalien auf chemischem Wege vorgenommen werden und zwar mit Ammonkarbonat¹⁷⁰⁾. Um einen brauchbaren Grenzstrom der Stufe zu erhalten, war es zweckmäßig, eine ca. 0,005-n Alkalikonzentration einzuhalten¹⁷¹⁾. Durch den Zusatz von Phosphorsäure wurde eine etwaige Störung durch die Gegenwart von Al, Mg, Ca und Fe ausgeschaltet¹⁷²⁾; schließlich polarographierten wir in 1%iger Tetramethylammoniumhydroxydlösung als Leitsalz. Um den Reststrom dieser Base zu vermindern, setzten wir noch 50%igen Alkohol und als weiteren Dämpfer noch einige Tropfen einer 0,01%igen Gelatine-

167) HEYROVSKY, J.: "Polarographie" in W. BÖTTGER "Physikalische Methoden der chemischen Analyse", Leipzig 1936, Bd. II, S. 260-322

168) HEYROVSKY, J.: "Polarographie", Wien 1941

169) LINSKENS, H. F.: "Papierchromatographie in der Botanik", Berlin-Göttingen-Heidelberg 1955, S. 45

170) v. STACKELBERG, M.: "Polarograph. Arbeitsmethoden", Bln. 1950, S. 108

171) ABRESCH, K.: Angew. Chem. 48, 683 (1935)

172) MAJER, V.: Z. analyt. Chem. 92, 321 (1933)

lösung hinzu. Bessere Aufzeichnungen erhielten wir letzten Endes in Lösungen, die durch Durchleiten von Wasserstoff entlüftet waren

Die Halbstufenpotentiale lagen zwischen - 2,11 und - 2,13 V, was für Natrium und Kalium zutrifft.

Die Natrium- und Kaliumstufen fallen so nahe zusammen, daß sie polarographisch nicht zu trennen sind. Man kann bei Anwesenheit beider nur die Summen bestimmen und das nur annähernd wegen der Ungleichheit der Diffusionskoeffizienten¹⁷³⁾. Auf Grund der Eichkurve konnten wir aus der erhaltenen Kurvenhöhe für Natrium und Kalium einen Gesamtgehalt von 3,9% errechnen.

Die Polarographie von CALCIUM wurde in einer ca. 0,001 m Lösung vorgenommen. Als Leitsalz diente 0,15 m Tetraäthylammoniumjodidlösung. Ferner wurde 50%iger Alkohol zugesetzt und gleichfalls entlüftet. Zunächst erhielten wir ein Maximum mit einem schlechten Grenzstrom. Erst nach Zusatz von Ba^{++} als Dämpfer konnten brauchbare Werte erhalten werden¹⁷⁴⁾¹⁷⁵⁾.

Das Halbstufenpotential betrug - 2,13 V; quantitativ dürften ca. 1,2% Calcium in der Pflanzenasche enthalten sein.

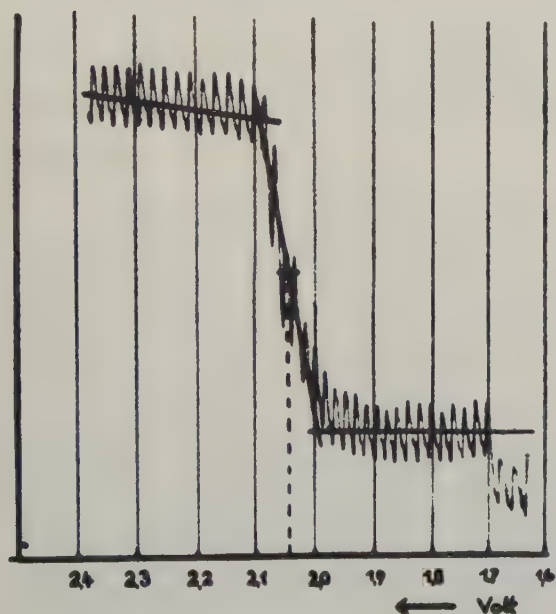


Abbildung 9

Polarogramm von Natrium
und Kalium

(aufgenommen mit dem Polarographen nach Dr.B.Lange)

Galvanometer-Empfindlichkeit 1:100

173) MAJER, V.: Z.analyt.Chem. 92, 401 (1933)

174) ZLOTOWSKI, J. u. J.M.KOLTHOFF: J.physik.Chem. 49, 386 (1945)

175) v.STACKELBERG, M.: "Polarographische Arbeitsmethoden",
Berlin 1950, S. 12

VI. Diskussion

Betrachtet man die einzelnen gefundenen Inhaltsstoffe im Hinblick auf eine mögliche antithyreoidale Wirkung, so dürfte den Säuren, den Saponinen, dem Gerbstoff, den ätherischen Ölen und den Zuckern kaum eine spezifische Rolle zukommen. Diese Stoffe wirken möglicherweise als günstige Lösungsvermittler.

Die FLAVON-GLYKOSIDE dagegen können für die Nebenwirkungen, für eine verbesserte Tachykardie und bisweilen für eine erhebliche Diurese verantwortlich sein.

Hinsichtlich einer eventuellen therapeutischen Wirksamkeit wäre zunächst der FLUORGEHALT der Droge zu diskutieren. Außer dem Präparat "Pardinon" ^{*)}, einem 3-Fluor-Tyrosin und dem Thyreostaticum "Ebewe" ^{*)}, einem Fluor-oxy-phenylelessigsäure-Präparat, wurde in letzter Zeit auch Natriumfluorid an hyperthyreoiden Personen mit teilweisem Erfolg in klinischen Versuchen angewendet ¹⁷⁶⁾.

Wesentlich mehr Bedeutung dürfte hingegen den AMINOSÄUREN zukommen. Diese Annahme wird durch eine papierchromatographische Untersuchung des Präparates "Thyreogutt" ^{*)} gestützt. In orientierenden Chromatogrammen konnten wir weder Flavonglykoside noch Pflanzensäuren oder Phospholipide, sondern nur Aminosäuren nachweisen und zwar dieselben wie in unserem untersuchten Lycopus-Extrakt.

Die Aminosäuren spielen bekanntlich im Organismus eine mannigfache Rolle ¹⁷⁷⁾ und können zu einer Störung oder auch Normalisierung der Schilddrüsentätigkeit führen. Das Tyrosin wird unter anderem als Vorstufe des Schilddrüsenhormons Thyroxin angesehen, und eine mangelhafte Tyrosinversorgung verursacht eine Störung der Schilddrüsen- und Nebennierenfunktion ¹⁷⁸⁾. Halogensub-

176) GALETTI, P.M.: Helv.med.Acta 24, 209 (1957)

177) ROSE, W.C.: Chem.Engn.News 30, 2385 (1952)

178) KENDALL, E.C.: "Thyroxin", New York 1947

*) Pardinon der Farbenfabriken Bayer, Leverkusen
Ebewe der Firma E. Bertalanffy, Unterach am Attersee, Österr.
Thyreogutt der Firma Dr.W.Schwabe, Karlsruhe.

stitutionspräparate des Tyrosins werden gegen Schilddrüsenüberfunktion angewendet. So wird schon seit längerer Zeit das Präparat "Pardinon" mit Erfolg in der ärztlichen Praxis verordnet. Auch die Glutaminsäure scheint nach neuesten Arbeiten¹⁷⁹⁾ eine gewisse Rolle beim Thyroxinaufbau zu haben. Weiter ist das Methionin, eine schwefelhaltige Aminosäure, anzuführen, das gleichfalls die Schilddrüsenfunktion steuert¹⁸⁰⁾. Das Phenylalanin, das stets bei der Aminosäure-Biosynthese als Vorstufe vertreten ist, weist auf den Aufbau dieser Aminosäuren hin¹⁸¹⁾.

Obwohl bisher pharmakologisch noch nicht geprüft wurde, ob der antithyreoid wirksame Stoff nun tatsächlich in der Gruppe der Aminosäuren in Kombination mit dem Fluor zu suchen ist, wird mit dieser Gesamtanalyse ein Weg für spätere Untersuchungen gewiesen. Außerdem konnten therapeutisch in Frage kommende Stoffgruppen von weniger wichtigen oder nicht spezifisch wirkenden geschieden werden.

Abschließende vergleichende Untersuchungen von LYCOPUS EUROPAEUS, LYCOPUS EXALTATUS und LYCOPUS VIRGINICUS ergaben, daß die beiden ersten in ihren Inhaltsstoffen weitgehend übereinstimmen, während Lycopus virginicus qualitativ und quantitativ weniger Aminosäuren, sowie wahrscheinlich auch andere Flavonglykoside und andere Pflanzensäuren enthält.

179) PITT-RIVERS, R. u. A.T.JAMES: Biochem.J. 70, 173 (1958)

180) ROSE, W.C., J.E.JOHNSON u. W.J.HAINES: J.biol.Chemistry 182, 541 (1950)

181) ROSE, W.C., D.T.WARNER u. W.J.HAINES: J.biol.Chemistry 193, 605 (1951)

C. Experimenteller Teil

I. Papierchromatographie

Wir chromatographierten vorwiegend absteigend in großen Glaskammern (20 x 30 x 60 cm) der Fa. Bender & Hobein, München, die mit den Unterphasen der angewandten Fließmittel gesättigt waren. Bei einigen Untersuchungen erwies sich die aufsteigende Methode als geeigneter, so bei den Anionen und Kationen, sowie bei Fetten, Fettsäuren, Phosphorsäureestern und Lipoiden. Hier verwendeten wir Rundkammern bzw. geschliffene Glasglocken.

Die Arbeiten wurden mit den Papieren 2043b Gl. und 2043b Gl. "gewaschen" der Fa. Schleicher & Schüll, Dassel, durchgeführt. Beim Besprühen mit sehr aggressiven Reagenzien, wie z.B. mit Salpetersäure, verwendeten wir das härtere Papier Typ 2045a.

Auf Papieren, die mit Formaldehyd vorbehandelt wurden, chromatographierten wir Lipide und Fettsäuren.¹⁸²⁾

Für schnelle orientierende Untersuchungen erwiesen sich die fünfgeteilten Rundfilter Marke "Ederol" (Nr. 208, Durchmesser 14,5) der Fa. I.C.Binzer, Hatzfeld/Eder als sehr dienlich.

Die Fließmittel für die einzelnen Stoffgemische sind jeweils im Allgemeinen Teil angegeben, während die zur Charakterisierung dienenden Sprühreagenzien auf Seite 53 zusammengefaßt sind.

Die Auswertung der Chromatogramme im UV-Licht erfolgte mit einer UV-Quarzlampe H.P.W.125 (maximale Strahlung bei 366 mμ).

Für die präparative Papierchromatographie fertigten wir Streifenchromatogramme an, markierten nach dem Entwickeln und Trocknen die Zonen unter der UV-Lampe und schnitten die zu untersuchenden Zonen aus. Nach Zerkleinern der ausgeschnittenen Streifen wurden diese mit kaltem Methanol mazeriert (Oxyzimtsäuren nur einen Tag! - Glykoside drei Tage).

182) HÖRHAMMER, L., H. WAGNER u. G. RICHTER: Biochem. Z. 331, 156 (1959)

II. Dünnschichtchromatographie

Zur Bereitung der Kieselgel-Platten wurde völlig glattes Spiegelglas verwendet (4 mm dick, Größe 12 x 20 cm). Pro Platte rieben wir 5 g Kieselgel der Fa. Merck mit 9 ml Wasser schnell an und brachten den Brei mittels eines Metallstreichers, der auf einer Glasschiene läuft, auf die Platten auf. Die Platten wurden dann 30 Min. bei 105° C getrocknet. Die Schichtdicke soll ca. 200 µ betragen.

Mit Hilfe einer Schablone markiert man mit einer Präpariernadel die Startpunkte, sowie das "Ziel". Das Fließmittel ließen wir 10 cm, 12 cm und 15 cm hoch laufen (berechnet von der Startlinie aus). Am geeignetsten erwies sich eine Höhe von 12 cm. Jegliche Beschriftung erfolgte durch Einkratzen mit einer Nadel. Mit Schmelzpunktsröhrchen wurden geringe Mengen des verdünnten Öles aufgetragen. Beim Einstellen der Platten in das Lösungsmittel in kleinen Rundkammern ist auf gleichmäßige Eintauchtiefe und auf einen absoluten dichten Verschuß der Gläser zu achten. Die Platten ließ man an der Luft trocknen und besprühte sie dann mit den verschiedenen Reagenzien. Anschließend wurden die Platten ca. 10 Min. bei 100-110° C getrocknet, wobei die Substanzen als Farbflecke kräftig hervortraten.

Damit die Platten für neue Bestimmungen verwendet werden konnten, wurden die Punkte entweder auf Transparent-Papier durchgezeichnet, oder die Kieselgelschicht wurde mit einer Mischung Subitogen 3 N^{*)}/Azeton/wassergesättigtes Äthylazetat (6:4:12) direkt von der Platte abgezogen. Zu diesem Zwecke goß man obige Lösungen über die entwickelten Platten und ließ diese ca. 30 Min. eintrocknen. Nach dieser Zeit legten wir die Platten in lauwarms Wasser und lösten die gefestigte Kieselgelschicht vorsichtig mit einem Messer von der Glasplatte.

*) Subitogen 3 N der Fa. Anorgana G.m.b.H, Gendorf bei Burg-
hausen.

III. Papier-Elektrophorese

Dieser Versuch wurde mit der Elektrophoresekammer "Elphor-H" nach W. Grassmann und K. Hannig (Hersteller Fa. Bender & Hobein, München) durchgeführt. Wir verwendeten die für das Gerät zurechtgeschnittenen (abgepaßten) Filtrierpapierstreifen (Nr. 2043a Mgl. der Fa. Schleicher & Schüll, Dassel) und trugen mit einer Blutzuckerpipette in der Mitte auf etwa 3 cm Breite die zu untersuchenden Lösungen in verschiedenen Konzentrationen auf. Die Streifen wurden mit der Pufferlösung bis kurz vor die Auftragstelle getränkt, so daß erst nach Einspannen bzw. Auflegen in die Rahmen und nach Einschalten des Stromes die Streifen durch ihre eigene Saugkraft vollkommen durchtränkt wurden. Wir vermieden dadurch ein Verschmieren des aufgetragenen Streifens. Bei einem Gleichstrom von 110 Volt bzw. 440 Volt führten wir während 20 Stunden die Elektrophorese durch, wobei wir in Zeitabständen von jeweils 3 Stunden einen Streifen herausnahmen, diesen an der Luft trockneten und darauf mit verschiedenen Reagenzien besprühten.

Wir benutzten folgende Pufferlösungen:

1. Veronalnatrium-Natriumazetat-Puffer (p_H -Wert 8,0).
Zu 29,43 g Veronalnatrium, 19,43 g Natriumazetat + 3 Mol. H_2O und 12,52 g Kaliumoxalat + 1 Mol. H_2O fügten wir n/10 Salzsäure hinzu, bis ein p_H -Wert von 8,0 erreicht wurde.

2. Pyridin-Methanol-Eisessig-Wasser. 1950 ml Wasser mischten wir mit 100 ml Pyridin und 50 ml Methanol und brachten mit Essigsäure die Lösung auf einen p_H -Wert von 5,2 - 5,4.

Bei der ersten Pufferlösung legten wir eine Spannung von 110 Volt an, bei der zweiten verwendeten wir 440 Volt. In letzterem System erhielten wir die beschriebenen Trenneffekte.

1) Sprühreagenzien für Papierchromatographie, Elektrophorese und Dünnschichtchromatographie (I - III)

Soweit keine anderen Angaben gemacht werden, gingen wir nach folgendem Arbeitsgang vor: Wir ließen die Chromatogramme nach dem Entwickeln an der Luft trocknen, markierten unter der UV-Lampe evtl. fluoreszierende Punkte, sprühten darauf mit einem "Elphor-Sprüher" (Fa. Bender & Hobein, München) die folgenden Reagenzien gleichmäßig auf und trockneten zuletzt vor dem Föhn.

a) Flavonglykoside

- 1) 5%ige wässrige Aluminiumsulfatlösung,
- 2) basische Bleiazetatlösung (Liquor Plumbi subacetici DAB.6.,
- 3) 2%ige methanolische bzw. wässrige Eisen-III-chloridlösung,
- 4) Zirkonoxychloridlösung und Zitronensäurelösung, siehe S.76
- 5) Echtblausalz-B-Lösung, siehe S.76.

b) Organische Pflanzensäuren

- 1) siehe Allgemeiner Teil, S. 35, 36 und 37.
- 2) Zum Nachweis von Chinasäure verwendeten wir eine 0,25%ige methanolische Morin-Lösung.

c) Cumarine

- 1) 1%ige äthanolische Kalilauge,
- 2) diazotierte Sulfanilsäure: Reagens A : 0,5 g Natriumnitrit in 250 ml Wasser. Reagens B : 0,8 g Natriumsulfanilat in 245 ml Wasser, dann Zugabe von 5 ml konzentrierter Salzsäure. Vor dem Besprühen werden die Lösungen zu gleichen Teilen gemischt. Die Lösungen sind im Kühlschrank aufzubewahren.

d) Gerbstoffe

- 1) 2%ige Eisen-III-chloridlösung
- 2) Kaffeesäuregerbstoffe, siehe organische Säuren, S.35-37.

e) Aminosäuren

0,2% Ninhydrin in 95 ml Butanol + 5 ml 2n Essigsäure.

Nach dem Besprühen wurden die Chromatogramme sofort bei 110° C 7 Minuten lang getrocknet.

f) Saponine

Blutlösung: Durch Mischen von 20 ml defibriniertem Rinderblut mit 80 ml physiologischer Kochsalzlösung wurde eine verdünnte Blutkörperchenaufschwemmung bereitet. Mit dieser Lösung besprühten wir die getrockneten Chromatogramme gleichmäßig und beobachteten nach 5 Minuten die weißen Hämolysehöfe.

g) Alkaloide

1) Modifiziertes Dragendorff-Reagens¹⁸³⁾

Lösung I: 850 mg Wismutsubnitrat	Lösung II: 8 g Kaliumjodid
40 ml Wasser	10 ml Wasser
10 ml Eisessig	

Vor dem Besprühen wurden 5 ml Lösung I mit 5 ml Lösung II, mit 20 ml Eisessig und 100 ml Wasser gemischt.

2) Konzentrierte Salpetersäure (Dichte 1,4)

h) Phosphatide und Phosphorsäureester

1) Ninhydrin, siehe Aminosäuren.

2) Phosphormolybdänsäure: Die Chromatogramme wurden in einer Glaswanne (32 x 26 cm) kurze Zeit in eine 1%ige wässrige Lösung von Phosphormolybdänsäure eingetaucht, dann 3x ca. 10 Minuten ausgewaschen und schließlich durch Eintauchen in eine 1%ige wässrige Stannochloridlösung reduziert. Anschließend wässerten wir die Chromatogramme einige Minuten mit gewöhnlichem Wasser und ließen sie an der Luft trocknen.

3) Rhodamin-B-Lösung: Wir legten die Chromatogramme ca. 25 Minuten in eine 0,01%ige Lösung, wässerten danach die Papiere 3 x 10 Minuten und ließen dieselben an der Luft trocknen.

4) Nilblau: Wir behandelten die Chromatogramme ca. 10 Minuten in der Glaswanne mit einer neutralen, 0,1%igen wässrigen Nilblaulösung, wuschen tüchtig aus und trockneten die Papiere an der Luft.

5) Ammoniummolybdatlösung: Zuerst wurden die Chromatogramme mit einer Lösung von 5 ml Perchlorsäure + 10 ml n/HCl + 25 ml 4%ige Ammoniummolybdatlösung + Wasser ad 100 ml besprüht, dann genau 7 Minuten bei 85° C im Trockenschrank erhitzt, 2-3 Minuten über Wasserdampf gehalten und schließlich mit H₂S-Gas reduziert.

183) MUNIER, R. u. M. MACHEBOEUF: Bull. Soc. Chim. biol. 33, 846 (1951)

i) Zucker

- 1) Wir besprühten mit einer Lösung von 0,93 g Anilin + 1,66 g o-Phthalsäure in 100 ml wassergesättigtem Butanol und trockneten anschließend sofort 10 Minuten bei 110° C.
- 2) Orcin-Reagens auf Ketosen: Wir stellten eine Lösung von 0,5 g Orcin + 15,0 g Trichloressigsäure + 100 ml wassergesättigtem Butanol her und besprühten damit die trockenen Chromatogramme; anschließend wurde 15-20 Minuten bei 105° C erhitzt.
- 3) Phloroglucin-Salzsäure: Das Sprühreagens besteht aus 25 ml Eisessig + 1 ml HCl 25%ig + 2,5 ml 5%iger alkoholischer Phloroglucinlösung. Nach dem Besprühen ließ man die Chromatogramme bei Raumtemperatur trocknen und erhitzte dann im Trockenschrank 2 Minuten bei 90° C.

k) Ätherische Öle

- 1) Gesättigte Lösung von Antimon-III-chlorid in Chloroform,
- 2) 20 Teile Antimon-5-chlorid in 80 Teilen Tetrachlorkohlenstoff,
- 3) 2%ige äthanolische Eisen-III-chloridlösung,
- 4) Reagens nach R. H. Horrocks (Aldehyd-Reagens), bestehend aus einer 0,5%igen Lösung von Benzidin in einer Mischung aus Äthanol und Eisessig (4:1),
- 5) gesättigte Lösung von 2,4-Dinitrophenylhydrazin in 2n Salzsäure (Nachweis von Ketonen und Aldehyden).

Die Arbeitsweise, die wir bei der Dünnschichtchromatographie anwendeten, ist auf Seite 51 beschrieben.

l) Kationen

- 1) Die Chromatogramme wurden mit einer 0,1 m (1,57 g Violursäure in 100 ml Wasser) Violursäurelösung besprüht und bei 60° C getrocknet.
- 2) Oxytriphenylmethanfarbstoff-Reagens (Mg und Ca): Wir besprühten die Papiere mit einer Lösung von 0,1 g "Bleu ciel au chrome" (Ciba) und 1 ml Äthylendiamin in 100 ml Wasser. Die feuchten Chromatogramme hielten wir dann über Ammoniakdämpfe.
- 3) Zum Aluminiumnachweis besprühten wir zuerst mit einer 0,2%igen alkoholischen Alizarinlösung, räucherten dann mit NH₃ und erwärmten die Papiere auf ca. 40° C.
- 4) Zum Nachweis von Chrom und anderen Metallen besprühten wir mit einer 5%igen wässrigen Natriumnitritlösung, ließen am kalten Föhn kurz antrocknen und besprühten weiter mit einer 1%igen Benzidinlösung in Eisessig.

m) Anionen

- 1) Fluorid: Gesättigte wässrige Eisen-rhodanidlösung $\text{Fe}(\text{CNS})_3$
- 2) Chlorid: Besprühen mit einer 0,1 m wässrigen Silbernitratlösung, dann ca. 30 Minuten wässern, anschließend trocknen und mit Ammoniumsulfid $(\text{NH}_4)_2\text{S}$ besprühen.
- 3) Phosphat: Besprühen zunächst mit einer warmen Lösung von 4% Ammoniummolybdat gelöst in Wasser + 10 ml konz. Salpetersäure, dann trocknen lassen und schließlich noch mit Ammoniumsulfid behandeln.

2) Qualitative Nachweis- bzw. Gruppenreaktionen

a) Glykoside

1) 2 ml möglichst konzentrierter, wässriger Lösungen von verschiedenen Auszügen wurden mit einigen Tropfen einer 20%igen weingeistigen Lösung von α -Naphtol versetzt und mit konzentrierter Schwefelsäure unterschichtet. Bei Gegenwart von Glykosiden trat ein blauer bis violetter Ring auf, beim Schütteln nahm die ganze Flüssigkeit diese Farbe an.

2) Spezielle Flavon-Glykosid-Reaktionen, siehe S. 76.

b) Gerbstoffe

- 1) 0,5%ige wässrige Gelatinelösung, die tropfenweise (Überschuß ist zu vermeiden!) zugegeben wurde. Zur Haltbarmachung dieser Lösung gaben wir 5% NaCl oder 0,5 n HCl hinzu.
- 2) 0,1%ige methanolische Brucin-Lösung.

c) Saponine

Blutgelatine: Wir lösten 3 g Gelatine in 100 ml 0,85%iger Kochsalzlösung, versetzten 5 g dieser Gallerte mit 5 Tropfen defibriniertem Rinderblut und rührten gut um. Die Trockenextraktteilchen legten wir auf eine Glasplatte bzw. einen Objektträger in einige Tropfen dieser flüssigen Blutgelatine, bedeckten mit einem Deckglas und brachten die Glasplatte auf eine Schale mit Eis. Bei Gegenwart von Saponin entsteht um die zu untersuchende Substanz ein hämolytischer Hof.

d) Ursolsäure

- 1) Wir brachten einige Kristalle auf eine Tüpfelplatte und gaben einen Tropfen konzentrierter Schwefelsäure hinzu.
- 2) In der gleichen Weise betupften wir noch mit Chlorsulfonsäure und mit Thionylchlorid.

IV. Semi-Mikrowasserdampfdestillation

Die Apparatur nach N. D. CHERONIS¹⁸⁴⁾ besteht aus einer in sich geschlossenen Wasserdampfdestillationsanordnung und einem Mikrokondensor. Wir änderten die Apparatur dahingehend ab, daß wir zunächst die Korken und Gummistopfen durch Normalschliffe ersetzten (NS 19, NS 29 und NS 45); ferner ließen wir das Überleitungsrohr der flüchtigen Stoffe nahe an das Kühlrohr herangehen und fingen das Kondensat in einem Mikrobecherglas innerhalb der geschlossenen Kondensorapparatur auf. Die beiden Teile, sowie die verschiedenen Glasrohre verbanden wir mit Polyäthylenschläuchen (siehe Abb. 10).

Beim Erzeugen des Wasserdampfes wird gleichzeitig die Untersuchungslösung, die in den Langhalsrundkolben A gefüllt wird, in schonender Weise erhitzt. Der Verlauf der Destillation muß vor allem zu Beginn mit dem Druckausgleichsrohr D geregelt werden. Eine Überhitzung ist dienlichst zu vermeiden.

184) CHERONIS, N.D.: "Semimicro and Macro Organic Chemistry", New York 1942, S. 167-170

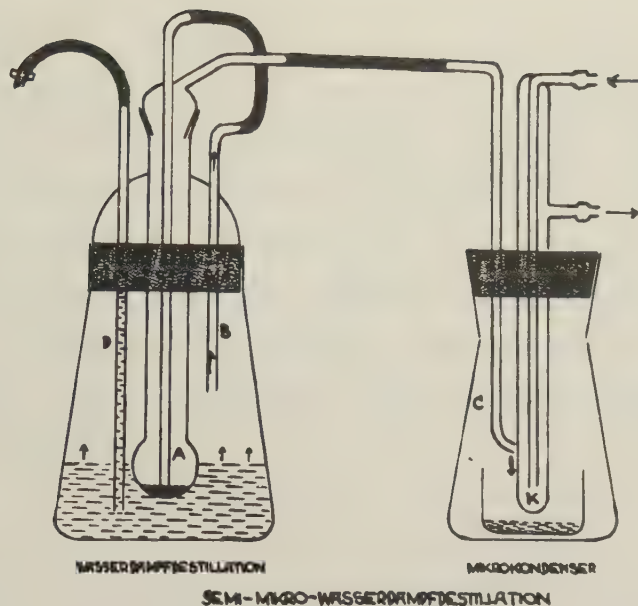


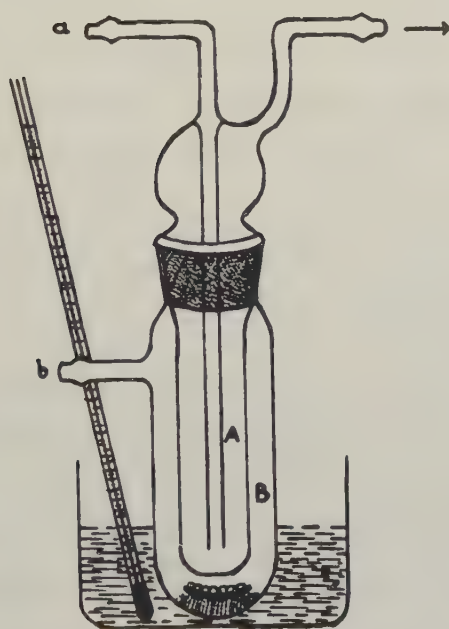
Abbildung 10

V. Mikrosublimation unter vermindertem Druck

Sehr viele Substanzen die sublimieren, zersetzen sich vorher an der Luft oder schlagen sich an dem allmählich heiß werden- den Rezipienten nicht nieder. Für diese und alle anderen sublima- tionsfähigen Körper eignet sich sehr gut die geschlossene Appara- tur von G. KLEIN und O. WERNER¹⁸⁵⁾. Zur Förderung der Sublimation arbeitet man unter vermindertem Druck, wobei man nun auch solche Substanzen erhält, die unterhalb ihres Zersetzungspunktes unter normalem Druck praktisch nicht sublimierbar sind. Dazu kommt noch als weiterer Vorteil des Apparates die Kühlung der Vorlage (A), sowie der günstig gewählte Abstand des Rezipienten von der Untersuchungssubstanz. Ferner kann gleichzeitig die Temperatur abgelesen werden.

185) KLEIN, G. u. O. WERNER, ref. in G. KLEIN: "Handbuch der Pflan- zenanalyse", Wien 1931, Bd. I, S. 317

Zur Aufnahme der Substanz diente ein flaches Schälchen aus 0,3 mm starkem Kupferblech, das zur gleichmäßigen Temperaturverteilung auf feinen Eisenfeilspänen lag. Zum Auffangen des Sublimates wurde ein rundes Deckgläschen (20 mm) verwendet, das wir mit einem Klebstoff oder mit einem Tropfen wasserfreiem Glycerin an der planen unteren Kühlerfläche anklebten. Der Abstand von der Substanz zum Deckglas betrug ca. 4-5 mm. Das Anheizen des Apparates geschah in einem Ölbad, dessen Temperatur gemessen werden konnte.



MIKROSUBLIMATIONSAPPARAT
MIT KÜHLUNG UND UNTER VERMINDERTEM DRUCK

VI. Ätherische Ölbestimmung

Wir verwendeten den "Neo-Clevenger" nach O. Moritz, bei dem wir am Druckausgleichsrohr noch einen Rückflußkühler anbringen ließen. Wir konnten dadurch das Drogengut stärker erhitzen, ohne daß sich dabei ätherisches Öl verflüchtigen konnte.

Jeweils 100 g leicht gerebelte und vorher vorsichtig getrocknete Droge wurden mit 200 ml Wasser im Destillationskolben langsam erhitzt und das überdestillierte ätherische Öl in dem oberen bauchigen Teil des mit gesättigter Kochsalzlösung gefüllten Meßrohres aufgefangen. Erst nach Abstellen der Destillation (nach etwa 4 Stunden) ließen wir die Kochsalzlösung herauslaufen, wobei das gelbe ätherische Öl in die verengte, graduierte Röhre eintrat und hier die Volumenprocente abgelesen werden konnten.

Mit derselben Apparatur rektifizierten wir für spätere Untersuchungen das gewonnene Öl.

Der BRECHUNGSINDEX wurde mit einem Zeiss "Abbé"-Refraktometer^{*)} gemessen und zwar bei einer Temperatur von $t = 22^{\circ} \text{C}$. Daraus ergibt sich für unser ätherisches Öl $n_{\text{D}}^{22^{\circ}} = 1,57$.

Die DICHTEN bestimmten wir mit dem "Krutzsometer"^{**)}. Da für die Untersuchung nur etwa 0,3 ml zur Verfügung standen, mußten wir die Dichte mit einer von dem Hersteller speziell für kleine Flüssigkeitsmengen angegebenen Formel errechnen.

Aus der Formel: $\frac{972 a}{h_1 - h_2 \cdot 1,5}$ ergab sich die Dichte von 0,975.

a = die an der roten Vergleichslösung abzulesende Dichte

$h_1 - h_2$ = Höhe der Flüssigkeitssäule in der Meßkapillare.

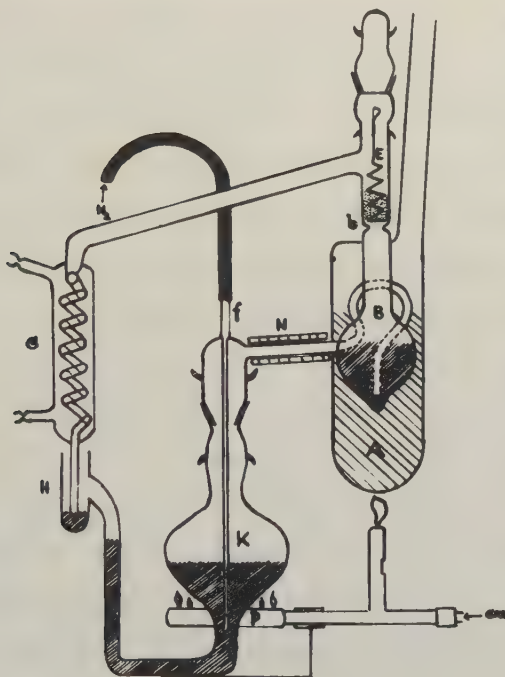
Die OPTISCHE DREHUNG bestimmten wir im Halbschattenpolarimeter nach F. Lipprich der Fa. Schmidt & Haensch, Berlin-Schöneberg, vor der Natriumlampe bei 20°C . Wir beobachteten den Drehwert nach einer und nach 14 Stunden.

^{*)} Carl Zeiss, Oberkochen/Württbg.

^{**)} Dr. Ing. Joh. Kruttsch, Physik. u. Chem. Apparate, München.

VII Fluor-Bestimmung

Die Apparatur (siehe Abb. 12) besteht aus dem von einem Heizmantelgefäß A umgebenen Destillationskolben B mit angeschmolzenem Schlangenkühler G und der am Dampfeinleitungsrohr N mit Federn befestigten Vorlage K mit Überlaufbecher H. Das Destillationsgefäß wurde aus Duranglas angefertigt, während die Vorlage aus Jenaer Glas bestand.



APPARATUR ZUR H_2SiF_6 -DESTILLATION UNTER KREISLAUF FÜHRUNG
DES WASSERS.

Abbildung 12

Das in der Probe enthaltene Fluor wird in stark saurer Lösung zu H_2SiF_6 umgesetzt und mit überschüssigem Wasserdampf abdestilliert. Das Kondensat gelangt in den Überlaufbecher, von dort in die Vorlage, die zur Neutralisation mit einer Na_2SiO_3 -Lösung (5n- Na_2SiO_3 -Lösung) beschickt ist. Durch Erhitzen mit dem

Ringbrenner P wird der Wasserdampf in den Destillationskolben zurückgeführt. Ein bei f eingeleiteter schwacher Gasstrom (Stickstoff) verhindert das Stoßen.

Eine Einschnürung bei b hält eine Silberdrahtspirale E, die ganz nach den Erfordernissen der Destillation locker mit Silberwolle gestopft wird. Sie dient als Spritzenfänger und hat darüberhinaus vor Glaswolle den Vorzug, daß bei der guten Leitfähigkeit des Metalles die in Dampfform übergehenden Spuren von Schwefelsäure bzw. Phosphorsäure in der längeren Kondensationszone weitgehend ausgewaschen werden.

Für die meisten Bestimmungen veraschten wir 100 g getrocknete Droge ohne jeglichen Zusatz trocken im Glühofen. Die weiße bis mausgraue Pflanzenasche digerierten wir mehrmals mit heißem Wasser (=Fluor ist darin als Na-fluorid bzw. Ca-fluorid gelöst) und engten die zusammengegebenen Filtrate im Vakuum auf ca. 15 - 30 ml ein. Diese Lösung wurde zusammen mit etwas Glasgrieß in das herzförmige Destillationsgefäß gegeben und entweder aus schwefelsaurer Lösung oder aus phosphorsaurer Lösung destilliert. Als Siedeflüssigkeit verwendeten wir in ersterem Falle Anisol ($K_p = 154^\circ \text{C}$) und im zweiten Falle p-Cymol ($K_p = 176^\circ \text{C}$). Wenn wir weniger Droge veraschten, konnte direkt eine Suspension der Asche in Wasser unter ständigem Einleiten von Stickstoff in den Destillationskolben gefüllt werden. Bei Fluormengen bis zu 10 mg werden 20 - 25 ml 85-90%iger H_3PO_4 ($d = 1,69$) oder die gleichen Mengen halbkonzentrierter H_2SO_4 ($d = 1,56$) hinzugegeben. Ist die Fluormenge größer, so muß vermieden werden, daß zu Beginn der Destillation die H_2SiF_6 -Konzentration im übergehenden Dampf zu hoch ist. In diesem Falle werden bis zu 25 ml Wasser hinzugefügt. Zu Beginn enthält der Kolben dann ein im Vergleich zu dem späteren Gleichgewichtszustand größeres Volumen an Flüssigkeit, d.h. die Säurekonzentration in der Lösung ist anfangs niedriger als sie sein soll. Bei unseren Versuchen gaben wir meist zu 25 ml Fluoridlösung noch 30 ml Säure.

In dem Überlaufbecher und in der Vorlage befinden sich etwa 50 ml Wasser, abzüglich der Menge, die in den Destillationskolben hinzugegeben werden mußte. Wir mußten etwa 30 ml Wasser

hinzufügen. In beide Gefäße gaben wir für eine zu erwartende Menge von 10 mg Fluor etwa 3 Tropfen der 5n- Na_2SiO_3 -Lösung; das ist etwa das Dreifache der zur Neutralisation erforderlichen Menge an Alkali.

Während ein ganz schwacher Gasstrom durch die Vorlage perlt, wird die Heizbadflüssigkeit in 2-3 Minuten mit großer Flamme zum Sieden erhitzt und von da ab mit der Sparflamme im Sieden gehalten. Man zündet dann den Ringbrenner an; dieser ist auf Grund von Probeläufen auf eine ganz bestimmte Flammenhöhe so eingestellt, daß mit einer Umlaufgeschwindigkeit des Wassers von 4 ml/Min. gearbeitet wird. Nunmehr kann die Destillation unbeaufsichtigt weiterlaufen. Die Flüssigkeit im Überlaufbecher verarmt dabei allmählich immer mehr an Alkali, bis schließlich die Gelbfärbung von tropfenweise zugesetztem Bromphenolblau das Vorhandensein geringer Mengen freier H_2SiF_6 anzeigt.

Nach 50 Minuten wurde die Destillation abgebrochen. Vor dem Abnehmen der Vorlage stellten wir zum Ausspülen des Kühlers das Kühlwasser für kurze Zeit ab, bis die Kondensationszone des Dampfes die letzte Windung erreicht hatte.

In der Vorlage konnten nun qualitative wie quantitative Nachweise geführt werden.

Mikrogravimetrische Fluorbestimmung mit Triphenylzinnchlorid

Für die Bestimmungen verwendeten wir jeweils nur die Hälfte der Vorlage und brachten die Untersuchungslösung zunächst auf einen p_H -Wert von 7,0. Die auf 10 ml eingeeengte Lösung wurde in einen Filterbecher gebracht und mit 12 ml einer gesättigten Lösung von Triphenylzinnchlorid in Chloroform versetzt. Als Reagens wird die ungefähr 2 1/2fache Menge der zu erwartenden Fluormenge verwendet. Der Filterbecher wurde verschlossen und 30 Minuten geschüttelt oder besser mittels eines Magnetstäbchens 30 Minuten lang gerührt. Anschließend ließ man die Fällung noch einige Minuten stehen und saugte dann beide Flüssigkeitsphasen ab. Mit wenigen Millilitern Wasser und Chloroform, die beide mit Triphenylzinnchlorid gesättigt waren, wuschen wir den Niederschlag

nach und trockneten den Filterbecher bei 110°C bis zur Gewichtskonstanz. Aus dem Fluorgehalt des bläulich-weißen Niederschlages, der 5,152% beträgt, konnte die Fluormenge in der Vorlage berechnet werden.

Die Destillate von 100 g veraschter Droge ergaben mit Triphenylzinnchlorid Niederschläge, die zwischen 1 g und 1,5 g schwankten; daraus errechnet sich ein Fluorgehalt von 0,051% - 0,081%. Nach H. BALCZO¹⁸⁶⁾ beträgt der Fluorgehalt des Niederschlages 5,152%.

Titration mit Thoriumnitrat

Wir ergänzten die überdestillierte, fluoridhaltige Lösung mit Wasser auf 60 ml und brachten sie auf einen p_{H} -Wert von 5 - 6,5. Zu der Untersuchungslösung wurden 1-3 Tropfen Indikator (0,1%ige Brenzkatechinviolettlösung) gegeben und die gelbe Lösung mit 0,01n bzw. 0,02 n Thoriumnitratlösung bis zum blauen Umschlag titriert. Kurz vor dem Umschlag wurde die Untersuchungsflüssigkeit grün, und von diesem Zeitpunkt an gaben wir vorsichtig nur tropfenweise die Thoriumnitratlösung hinzu.

1 ml 0,1 n Thoriumnitratlösung entspricht 1900 mg Fluorid.

VIII. Polarographie

Die Bestimmungen führten wir mit dem Polarographen nach Dr. B. Lange mit koordiniertem Tintenschreiber aus. Die elektrolytische Zelle bestand aus einem Becherglas von 50 ml Inhalt, dessen Boden mit einer Hg-Schicht bedeckt war, und der Glaskapillare von 0,03 - 0,1 mm innerem Durchmesser, die in die Untersuchungslösung eintauchte und mit einem birnförmigen Hg-Behälter verbunden war. Beim Einfüllen des Quecksilbers in das Niveaugefäß war darauf zu achten, daß keine Luftblasen im Schlauch zurückblieben, und wir füllten daher in kleinen Portionen unter Schütteln des Schlauches das vollkommen reine und trockene Queck-

186) BALCZO, H. u. H. SCHIFFNER: Mikrochim. Acta (Wien) 1829 (1956)

silber ein. Das Gefäß war beweglich an einem Stativ befestigt, so daß durch Verstellen der Höhe die gewünschte Tropfgeschwindigkeit eingestellt werden konnte. Die geeignetste Tropfzeit der Kapillarelektrode betrug 3 Sekunden pro Tropfen.

Für die Bestimmung von Natrium und Kalium trennten wir zunächst mit Ammoniumcarbonat die Erdalkali von den Alkali, ferner mußte die Asche nitratfrei sein. Nach Entfernen von NH_4^+ durch Abrauchen mit HCl wurde die weiße Asche in genau 100 ml heißem Wasser gelöst. Um die besprochene geeignete Alkalikonzentration zu finden, pipettierten wir in zunehmenden Mengenverhältnissen die Lösungen ab. Vor den Messungen säuerten wir mit Phosphorsäure schwach an und alkalisierten dann wiederum mit Tetramethylammoniumhydroxyd. Dieser Leitsalzzusatz wurde auch variiert, da für geeignete Messungen etwa der 50fache Überschuß vorhanden sein soll. Zuletzt setzten wir noch 10 - 20 ml 50%igen Alkohol und 3 - 5 Tropfen einer 0,01%igen Gelatinelösung hinzu und entlüfteten die Untersuchungslösung durch Einleiten von Wasserstoff.

Man ließ die Polarogramme zunächst bei den verschiedenen Empfindlichkeiten aufzeichnen - in den meisten Fällen arbeiteten wir dann mit der Galvanometer-Empfindlichkeit 1:100.

Der starke Ausschlag des Galvanometers bei 1,5 V ist apparativ bedingt und wird durch Umschaltung des Spannungspotentiometers vom Bereich 0 - 1,5 auf 1,5 - 3,0 hervorgerufen.

Die CALCIUM-Bestimmung wurde in ähnlicher Weise durchgeführt. Wir verwendeten hier als Leitsalz 0,15 m-Tetraäthylammoniumjodid-Lösung in geringerer Konzentration bei etwas größerer Tropfzeit der Quecksilberelektrode. Als Dämpfer gaben wir 10 ml von 50%igem Alkohol und ferner einige ml einer alkoholischen BaCl_2 -Lösung hinzu. Die Lösungen wurden ebenfalls entlüftet, und wir arbeiteten bei einer Galvanometer-Empfindlichkeit von 1:100.

IX. Veraschungen

1) Trockene Veraschung

Wir veraschten in einem Schmelzofen das genau gewogene und vorher im Trockenschrank bei 120-150° C getrocknete Material vorsichtig im Platin-Tiegel. Der Platin-Tiegel soll möglichst nicht sehr lange zur Rotglut kommen, um die Ausbildung eines unlöslichen Films im Tiegel zu vermeiden. Der Glühofen mußte mit einem vorgeschalteten Widerstand langsam erhitzt werden. Von Zeit zu Zeit ließ man durch Heben eines Asbestpfropfens im Deckel Luftsauerstoff hinzu, wodurch der Verbrennungsvorgang wesentlich gefördert wurde. Entwickelten sich brennbare Dämpfe, die sich entzündeten, so ließ man diese ruhig abbrennen und sorgte nur dafür, daß nicht durch zu stürmisches Erhitzen Rauch ausgestoßen wurde, der Pflanzenteilchen mitriß. War der erste Teil der Veraschung vorüber, so daß sich brennbare Dämpfe nicht mehr entwickelten, so ließ man den Tiegel erkalten und verrührte die schwarze, kohlige Masse mit halbkonzentrierter Salpetersäure (für die papierchromatographische Untersuchung der Kationen, mit halbkonzentrierter Salzsäure (für polarographische Bestimmungen) oder mit einigen Tropfen einer konzentrierten Lösung von Ammoniumnitrat (für Fluorbestimmung und für die Bestimmung des Aschegehaltes). Das neuerliche Erhitzen wurde nun wieder langsam begonnen und die Hitze allmählich gesteigert, jedoch nicht über dunkle Rotglut hinaus. Hatte die Asche reinweiße Farbe angenommen, so setzten wir bei der qualitativen Bestimmung noch etwas Oxalsäure hinzu, um die Carbonatbildung durchzuführen, glühten nochmals und brachten den Tiegel im Exsikkator zum Erkalten.

An die Feststellung des Aschegehaltes schloß sich die Bestimmung des in 10%iger Salzsäure unlöslichen Anteils der Asche. Zu diesem Zwecke erwärmten wir die Asche mit 10%iger Salzsäure, wobei unter Aufbrausen Kohlendioxyd entwich. Die Lösung wurde durch ein gewogenes Filter filtriert, das zunächst mit einigen ml Säure und dann mit Wasser bis zum Verschwinden der Salzsäurereaktion nachgewaschen wurde. Das Filter trockneten wir bis zur Gewichtskonstanz.

Der in Salzsäure unlösliche Anteil schwankte zwischen 1 und 2%.

2) Nasse Veraschung¹⁸⁷⁾

Die pulverisierte Droge wurde in einem Kjeldahl-Langhals-rundkolben mit 1 - 2 ml konzentrierter Schwefelsäure pro Gramm Trockenmaterial versetzt und während einer Stunde auf dem Wasserbad bzw. Sandbad erhitzt. Hierbei färbte sich die ganze Masse schwarz. Nun gab man vorsichtig einige Tropfen rauchender Salpetersäure zu und erwärmte weiter, wobei starke braune Dämpfe entstanden. Die Zugabe von rauchender Salpetersäure wurde so lange tropfenweise fortgesetzt, bis die Lösung farblos war. Anschließend rauchten wir die konzentrierte Schwefelsäure ab und versetzten den Rückstand 3mal mit je 5 ml rauchender Salpetersäure pro Gramm Material. Die Salpetersäure dampften wir jeweils bis nahe zur Trockene ein. Zuletzt spülten wir den Rückstand mit Salpetersäure aus dem Kolben in einen gewogenen Glühtiegel und trockneten hier die Lösung wiederum vorsichtig ein. Lag eine größere Menge von Asche vor, so war zu befürchten, daß infolge des Dekrepitierens der Salzkristalle, die häufig Kristallwasser einschließen, ein Verspritzen stattfand. Um dem vorzubeugen, verrieben wir die Salzmasse mit etwas Alkohol, ließen diesen verdunsten, wobei dann das Wasser mitverdunstete und begannen dann erst mit dem kräftigen Erhitzen.

Diese Methode erwies sich von allen anderen als die zweckmäßigste, da hierbei einerseits alles organische Material zerstört wurde und andererseits keine unlöslichen anorganischen Salze entstehen. Bestimmbar sind alle Kationen sowie die Anionen, mit Ausnahme von Sulfat, Nitrat und Carbonat.

187) LINSKENS, H.F.: "Papierchromatographie in der Botanik", Berlin-Göttingen-Heidelberg 1955, S. 44

X. Säulenchromatographie

1. Magnesol-Säule zur Vorreinigung bei der Glykosid-Isolierung

Wir verwendeten Glasröhren mit einem Durchmesser von 5 cm und einer Höhe von 35 cm, deren unteres Ende mit einem Tropfhahn verschließbar war. Die Säulen hatten bewegliche Porzellanplatten (dies gilt auch für die später folgenden Säulentypen) und konnten mit einer gleichmäßig dicken Schicht von Glaswolle abgedichtet werden. Watte und Filtrierpapier erwiesen sich als weniger geeignet, da sie meist nur eine sehr langsame Tropfgeschwindigkeit zuließen. Das Adsorptionsmittel (= 30 g Magnesol) schlämmten wir mit Methanol/Wasser (1:1) ziemlich dünnflüssig an und füllten in kleinen Portionen davon soviel in die Säule, daß nach Absitzen des Füllmaterials die Höhe der Magnesolsäule nicht mehr als 6 - 8 cm betrug. Durch wiederholtes Nachfüllen der Methanol/Wasser-Mischung wurde einmal die Säule ausgewaschen und zweitens wurde die Säule durch die Sogwirkung langsam und gleichmäßig gefestigt. Als etwa 5 mm der AnschlammLösung noch über der Säule standen, gaben wir den verdünnten wässerigen Extrakt auf die Säule und zwar am zweckmäßigsten durch Abfließenlassen aus einer Pipette an den Innenrand der Säule. In gleicher Weise verfahren wir bei der Zugabe der ersten 100 ml Eluationsmittel und vermieden dadurch ein Aufwirbeln der obersten Magnesolschichten. Als Lösungsmittel verwendeten wir zunächst Wasser und anschließend Methanol. In den wässerigen Fraktionen erschienen vor allem Pflanzensäuren, Zucker und zum Teil Glykosid A, während die Hauptmenge der Glykoside in den methanolischen Fraktionen enthalten war.

Mit dieser Versuchsanordnung wurde eine sehr günstige Tropfgeschwindigkeit von 30-40 Tropfen pro Minute erreicht.

2. Polyamid-Säulen zur Trennung der Flavonglykoside von Pflanzensäuren

Als Adsorbentien wählten wir die unter der Bezeichnung "PERLON" (Farbwerke Hoechst, Werk Bobingen), "DURETHAN" (Farbenfabriken Bayer, Leverkusen) und "ULTRAMID" (BASF, Ludwigshafen)

im Handel befindlichen pulverisierten Polyamidverbindungen. In den meisten Fällen verwendeten wir Perlonpulver "feinst", Maschenweite 0,2 mm (DIN 30). Wir arbeiteten mit einer Glassäule von einer lichten Weite von 5 cm und einer Höhe von 55 cm und füllten diese bis zu einer Höhe von 40 cm mit Polyamidpulver (allzu hohe Säulen sind weniger geeignet!). Das Füllmaterial wurde zunächst auf einem großen Faltenfilter mit heißem Methanol ausgewaschen und dann mit destilliertem Wasser zu einem dünnen Brei angerührt. Unter ständigem Abtropfenlassen und ohne jegliches Stopfen mit einem Glasstab füllten wir in kleinen Anteilen das angeschlämmte Pulver in die Säule. Nach dem Absitzen des Polyamidpulvers wuschen wir die Röhre so lange mit einem heißen Gemisch von Methanol/Wasser (70:30), bis beim Verdunsten von 50 ml des abtropfenden Lösungsmittels kein Rückstand blieb. Auf die nun gebrauchsfertige Säule trugen wir vorsichtig, d.h. an der Glaswand entlang, die wässerigen Glykosidlösungen auf und wuschen, nachdem die Substanzen adsorbiert waren (das Gemisch sollte dabei höchstens in einer 1 - 1,5 cm breiten Zone adsorbiert werden), mit destilliertem Wasser so lange aus, bis der größte Teil der damit eluierbaren Bestandteile aus der Säule entfernt war. Dann eluierten wir weiter mit reinem Methanol. Die Tropfgeschwindigkeit war auf ungefähr 30 Tropfen/Minute eingestellt. Die Wanderung der fluoreszierenden Säuren und vor allem der breiten, braunen Glykosidzone wurde im UV-Licht beobachtet und dementsprechend die Eluate fraktioniert aufgefangen. Im Tageslicht gaben sich die Glykosidfraktionen als schöne gelbe Lösungen zu erkennen. Bei entsprechender Zeiteinteilung (Füllung der Säule am Tage zuvor) konnte ein Säulenversuch immer an einem Tag abgeschlossen werden.

3. Zellulose-Säule zur Auftrennung von Glykosid A und B

Wir ließen das Zellulosepulver (Zellulosepulver Nr.125a für Säulenchromatographie der Fa. Schleicher & Schüll, Dassel) zunächst mit wassergesättigtem Essigester ca. 5 Stunden quellen. Danach füllten wir den dünnen Brei portionsweise unter ständigem Abtropfen des Lösungsmittels in die Säule. Bei diesem Füllmaterial war es zweckmäßig, die Masse leicht und gleichmäßig mit einem Glasstab zu stopfen. Ferner verwendeten wir bei dieser Trennung Röhren

mit kleinem Durchmesser (3 cm) und großer Füllhöhe (50 cm), und an Stelle der auswechselbaren Porzellanplatte befand sich eine eingeschmolzene grobe Sinterplatte (G 1). Um die Bildung von Luftblasen zu vermeiden, mußte beim Einfüllen darauf geachtet werden, daß die Zellolosesäule stets vom Lösungsmittel bedeckt war. Am oberen Ende der Säule war, durch einen Normalschliff verbunden, ein Schütteltrichter (500 ml) mit eingeschliffener Tropfkapillare angebracht, der die zutropfende Menge an Eluationsmittel selbständig mit der Tropfenzahl des abtropfenden Eluates regulierte. Die zu chromatographierende methanolische Glykosidlösung wurde mit Zellolosepulver zu einem dicken Brei angerieben und das Lösungsmittel darauf unter ständigem Umrühren durch Bestrahlen mit einem Oberflächenverdampfer und schwaches Erwärmen auf dem Wasserbade verdunstet. Das fein verriebene Trockenpulver streuten wir gleichmäßig auf die Lösungsmittelschicht, die etwa 5 mm über der Zellolosesäule stand, gaben eine dünne Schicht Glaswolle darauf und preßten die ganze Masse leicht zusammen. Die ersten 100 ml des Lösungsmittels (wassergesättigtes Äthylazetat) ließen wir wiederum an der Glaswandung vorsichtig hinzufließen, setzten den Schütteltrichter auf und ließen von dort selbsttätig das Eluationsgemisch zutropfen. Die Tropfgeschwindigkeit stellten wir auf ca. 40 Tropfen/Minute ein.

Diese Versuchsanordnung gewährte die gewünschten Trenneffekte, und wir erhielten in jedem Falle scharfe, gut voneinander getrennte Zonen.

4. Aluminiumoxyd-Säule zur Anreicherung evtl. vorhandener Alkaloide

Wir benutzten eine Glassäule mit eingeschliffener Sinterplatte (G 1) und einer lichten Weite von 27 mm und einer Höhe von 300 mm. Diese füllten wir unter ständigem Umrühren mit 100 g Adsorptionsmittel, das in Chloroform angeschlämmt war. Verwendet wurde Aluminiumoxyd "Woelm", basisch, mit der Aktivitätsstufe I, eluiert wurde mit reinem Chloroform. Das Auftragen der methanolischen bzw. wässerigen Lösungen geschah in ähnlicher Weise wie in 1. und 2. (siehe S. 68) beschrieben. In dem Eluat hätten die vorher in Freiheit gesetzten freien Alkaloidbasen erscheinen müssen.

Beim Eluieren mit Chloroform war zu beobachten, daß die Pflanzensäuren (Kaffee- und Chlorogensäure), sowie die Flavonderivate kräftig adsorbiert wurden und sich als eine intensiv gelbe Zone zuoberst in der Säule zeigten. Mit einer Mischung aus Ameisensäure und Methanol (1:1) waren diese Stoffe zu eluieren.

XI. Ionenaustauscher-Säulen

1. Dowex 2 zur Neutralisation der sauren Zuckerlösungen

100 g Anionenaustauscher, den wir reichlich mit Wasser angeschwemmt hatten, füllten wir portionsweise in eine Glassäule mit 2 cm lichter Weite. Abgedichtet wurde die Glasröhre mit einer Porzellanplatte und einer gleichmäßigen Schicht von Glaswolle. Zur Aktivierung spülten wir zuerst mit ca. 500 ml n-NaOH, dann mit 500 ml n-HCl durch, und schließlich ließen wir so lange eine gesättigte Lösung von Natriumbikarbonat in 70%igem Äthanol durchlaufen, bis sich eine schwach alkalische Reaktion zeigte. Mit 70%igem Alkohol wuschen wir zuletzt die Dowexsäule neutral. Die saure zuckerhaltige Lösung mußte diese vorbereitete Säule mit einer Tropfgeschwindigkeit von 15-20 Tropfen pro Minute passieren.

2. Lewatit CNS 20 zum Austausch der Kationen gegen H^+ bei der papierchromatographischen Bestimmung der Anionen

Wir verwendeten als Kationenaustauscher Lewatit CNS 20 der Farbenfabriken Bayer, Leverkusen, mit einer aktiven $-SO_3H-$ und einer $-COOH-$ Gruppe und einer Austauschkapazität von 5,0 mÄq/g.

Zur Bestimmung der Kapazität versetzten wir eine abgewogene Menge des frisch regenerierten Austauschers mit einem Überschuß von NaCl-Lösung. Wir schüttelten etwa 1/2 Stunde, saugten vom Harz ab und titrierten die freigewordenen H^+ -Ionen mit n/10 NaOH gegen Phenolphthalein. Die Aufschlußlösung, bei der die Na-Ionen ausgetauscht werden sollten, gaben wir dann auf eine Säule, in der mindestens das 1,5fache der für die eingewogene Soda berechneten Austauschmenge eingefüllt war und ließen in der sehr langsamen Tropfgeschwindigkeit von 10 Tropfen pro Minute abtropfen.

3. Amberlite IR-120 zur Trennung der Aminosäuren von anderen organischen Substanzen für die papierchromatographische Bestimmung

Der Kationenaustauscher Amberlite IR-120 der Fa. Roehm & Haas, Philadelphia/Pa., besitzt eine funktionelle saure-SO₃H-Gruppe (kerngebunden) und hat eine Kapazität von 4,2 mÄq/g. Mit diesem Harz werden sämtliche Basen zurückgehalten (auch Aminosäuren mit 2 Carboxylgruppen¹⁸⁸⁾¹⁸⁹⁾). Wir füllten eine etwa 3 cm weite Glassäule, die mit einer Porzellanplatte und einer darüberliegenden Glaswollschicht abgedichtet war, 35 cm hoch mit dem angeschwemmten Austauscher, den wir vorher einige Stunden quellen ließen. Die äthanolische Extraktlösung gaben wir nun auf die Austauschersäule, ließen mit ganz langsamer Tropfgeschwindigkeit die Lösung in das Harz eindringen (10 Tropfen/Min.) und wuschen anschließend die Säule mit reichlich Wasser aus. In dem wässrigen Eluat erschienen Säuren, Zucker und eine Reihe indifferenten Stoffe¹⁹⁰⁾. Die in der Säule verbliebenen Aminosäuren eluierten wir mit 1n-Ammoniak (Tropfgeschwindigkeit 40 Tropfen/Min.).

4. Amberlite IRA-400, Amberlite IR-120 und Lewatit CNS zur Isolierung organischer Pflanzensäuren

Amberlite IRA-400 der Fa. Roehm & Haas, Philadelphia/Pa., ist ein stark basischer Anionenaustauscher mit einem funktionellen $\equiv N^+$ und einer Austauschkapazität von 3,0 mÄq/g. Mit diesem Harz können alle Säuren, auch die schwachen, zurückgehalten werden.

Nach vorherigem Quellen wurden die drei Ionenaustauscher sorgfältig in Säulen 40 x 300 mm gefüllt und dort mit n-NaOH und n-HCl aktiviert und schließlich mit destilliertem Wasser ausgewaschen. Den Pflanzenauszug gaben wir zunächst auf die Amberlite IR-120-Säule und eluierten mit Wasser, wobei Säuren, Zucker und andere indifferente Stoffe durchliefen. Diese saure Lösung schick-

188) SCHRAMM, G. u. J. PRIMOSICH: Z. physiol. Chem. 282, 271 (1947)

189) FREUDENBERG, K., H. WALCH u. H. MOLTER: Naturwissenschaften 30, 87 (1942)

190) LEVY, L u. M. J. COON: J. biol. Chemistry 192, 807 (1951)

ten wir dann durch die Amberlite IRA-400-Säule, welche nun ihrerseits die Säuren zurückhielt. Mit n/10 NaOH, dem wir 10% Methanol zugesetzt hatten, eluierten wir aus der Säule die Säuren, die als Salze im Filtrat auftraten. Durch Passieren einer stark sauren Kationenaustauscher-Säule (Lewatit CNS) wurden zuletzt die Säuren freigemacht. Das derart erhaltene in etwa 0,6 l Wasser befindliche Säuregemisch wurde unter vermindertem Druck eingedampft.

XII. Craig-Verteilung

Wir arbeiteten mit der von E. HECKER¹⁹¹⁾ entwickelten 36stufigen Apparatur mit Handbetrieb (Größe 3) der Fa. E.Bühler, Tübingen.

Wir wählten für die Kaffeesäurereinigung nach K.HERRMANN¹⁹²⁾ als Oberphase Äther/Essigester (5:1) und als untere stationäre Phase 0,5 mol. Phosphatpuffer p_H 6,0. Da Oxyzimtsäure-Ester mit Äther oft nur schwer, dafür aber leicht mit Essigester der Pflanze entzogen werden können, variierten wir bei der Chlorogensäurereinigung die obere Phase zugunsten des Essigesters und zwar Essigester/Äther 3:2 bzw. 4:2.

Herstellung des Phosphatpuffers p_H 6,0: 13,4 g sekundäres Natriumphosphat ($Na_2H \cdot PO_4 \cdot 7 H_2O$) ad 100 g Wasser ergaben Stammlösung I", während 6,9 g primäres Natriumphosphat ($NaH_2 \cdot PO_4$) ad 100 g Wasser Stammlösung II" bildeten. 7,4 ml Stammlösung I wurden nun mit 42,6 ml Stammlösung II gemischt und mit Wasser auf 200 ml gebracht. Die Lösung wurde im p_H -Meter (Glaselektrode und Kalomelbezugselektrode) gemessen und hatte den gewünschten p_H -Wert von 6,0.

Bevor wir mit der eigentlichen Verteilung begannen, sättigten wir zunächst im Schütteltrichter Ober- und Unterphase gegeneinander ab. Wir füllten in sämtliche Elemente 10 ml Phosphatpuffer und nur in Element 0 10ml Oberphase. Dann starteten wir den Verteilungsprozeß (40mal schütteln, Absitzenlassen, Überlauf der

191) HECKER, E.: Chemie-Ing.-Techn. 25, 505 (1953)

192) HERRMANN, K.: Z.Lebensmittel-Unters.u.-Forsch. 106, 341 (1957)

Oberphase in das nächste Element und Zugabe neuer Oberphasen usw.) zunächst noch ohne gelöste Substanz und zwar bis Element 3. Dadurch sollte der Verlust von abgedunstetem Äther ausgeglichen werden. Darauf gaben wir in Element 0 den in 10 ml Oberphase gelösten Stoff und führten die Verteilung bis zur letzten Stufe durch. Diesen Verteilungsvorgang machten wir 10mal durch und erhielten so etwa 100 ml reine Lösung, aus der dann später die Substanzen auskristallisierten.

XIII. Identifizierung der Flavonglykoside A und B, sowie der Kaffee- und Chlorogensäure

1. Gemeinsame Untersuchungsmethoden

a) Schmelzpunkt:

Sämtliche Schmelz- und Mischschmelzpunkte (soweit authentische Substanzen vorhanden) sind korrigiert. Sie wurden mit dem Mikroschmelzpunktsapparat nach Kofler bestimmt.

b) UV-absorptionsspektrophotometrische Untersuchungen:

Für die Aufnahme der UV-Absorptionsspektren wurden Substanzlösungen bzw. Lösungen, die mittels präparativer Papierchromatographie erhalten waren, in einer geeigneten Konzentration von ungefähr 10^{-4} mol. bei einer Schichtdicke von 1 cm gemessen. Wir lösten dafür 2-6 mg Substanz in 100 ml Methanol p.a., bzw. wir mußten die Papiereluate so lange verdünnen oder auch einengen, bis wir eine geeignete Konzentration hatten. Für die Messungen verwendeten wir den Zeiss Opton-Spektralphotometer M 4 Q, sowie den Unicam-Quarz-Spektrophotometer S.P. 500 der Fa. Unicam Instruments, Cambridge.

c) Infrarotspektren:

Die IR-Spektren des Glykosides A, sowie von Kaffee- und Chlorogensäure wurden nach dem Trocknen im Hochvakuum in einer Konzentration von ca. 1 mg/300 mg KBr als Preßlinge im Perkin-Elmer-Infrarotspektrophotometer Nr. 21 gemessen.

d) Mikroanalysen:

Die CH-Bestimmungen von Glykosid A, Kaffee- und Chlorgensäure wurden vom Mikroanalytischen Laboratorium A. Bernhardt, Mülheim/Ruhr, durchgeführt. Für die Bestimmungen wurden die Substanzen bei 50° C im Hochvakuum konstant getrocknet.

2. Charakterisierung von Glykosid A und B

a) Papierchromatographische Vergleiche mit Testsubstanzen:

Die Testsubstanzen stammen aus der Sammlung der am Institut für Pharmazeutische Arzneimittellehre der Universität München bereits isolierten und identifizierten Substanzen.

T a b e l l e 8

	Glykosid A	Luteolin-7-monoglucosid	Aglykon A	Luteolin
Ä/A/W	0.365	0.36	0.863	0.86
B/E/W	0.40	0.405	0.78	0.78
I/A/W	0.425	0.43	0.285	0.28
unbesprüht	braun	braun	braun	braun
mit Al ⁺⁺⁺	gelbgrün	gelbgrün	gelbgrün	gelbgrün
mit Pb ⁺⁺	ocker	ocker	ocker	ocker

T a b e l l e 9

	Glykosid B	Aglykon B	Apigenin
Ä/A/W	0.569	0.937	0.93
B/E/W	0.579	0.42	0.42
I/A/W	0.582	0.88	0.88
unbesprüht	braun	braun	braun
mit Al ⁺⁺⁺	gelb	gelb	gelb
mit Pb ⁺⁺	leuchtend gelbgrün	leuchtend gelbgrün	leuchtend gelbgrün

b) Tauböck-Test:

5 ml einer ca. 10^{-3} molaren Glykosidlösung wurden in einer Porzellanschale schonend eingedampft, der Rückstand in wenig Azeton aufgenommen, 0,1 g Borsäure und 0,1 g Oxalsäure zugegeben und die Mischung erneut zur Trockene eingedampft. Den Rückstand nahmen wir in 3 ml Äther auf und beobachteten die Lösung unter dem UV-Licht, wobei wir eine gelbgrüne Fluoreszenz beobachten konnten.

c) Reduktions-Tests:

Jeweils 1 ml einer ca. 10^{-3} molaren methanolischen Flavonlösung versetzten wir mit 10 mg Zink bzw. Magnesiumpulver und gaben dann unter Kühlung 5 Tropfen konzentrierte Salzsäure zu. Um eine möglichst vollständige Reduktion der Flavone zu ihren Anthocyanen zu erhalten, wurde die Reaktion sehr langsam und unter ständiger Kühlung durchgeführt.

d) Eisenchlorid-Test:

Wir nahmen ca. 0,1%ige methanolische Glykosidlösungen und gaben im Reagenzglas einige Tropfen einer 0,1%igen wässrigen Ferrichloridlösung unter leichtem Umschütteln hinzu. Es entstanden sofort grüne bis grünbraune Färbungen.

e) Zirkon-Zitronensäure-Test mit nachfolgender Säurehydrolyse:

Dieser Test wurde auf den entwickelten Chromatogrammen ausgeführt. Wir besprühten die Chromatogramme mit einer 2%igen methanolischen Zirkonoxychloridlösung, markierten nach dem Trocknen unter der UV-Lampe die gelb fluoreszierenden Flecken und besprühten dann mit einer 5%igen wässrigen Zitronensäurelösung. Waren die Fluoreszenzfarben gelöscht, dann hielten wir das Chromatogramm einige Minuten über konzentrierte Salzsäuredämpfe, um bei Flavon-3-glykosiden eine Hydrolyse und damit ein erneutes Auftreten der Farbfluoreszenz zu erzielen.

f) Echtblausalz-Test:

Wir besprühten die entwickelten Chromatogramme mit einer 0,3%igen alkoholischen oder 0,5%igen wässrigen Lösung von Echt-

blausalz B^{*)}, einem tetra-azotierten Di-o-anisidin. Bei positiver Reaktion konnten nach einigen Stunden im Tageslicht deutlich die rotvioletten Flecken beobachtet werden.

g) Hydrolysen:

Wir führten bei beiden Glykosiden zunächst die Hydrolyse nach H. Kiliani durch und zwar in einer kurzen Zeitspanne. Dazu versetzten wir etwa 50 ml konzentrierter Glykosidlösungen mit 10 ml einer Mischung von konzentrierter Salzsäure/Eisessig/Wasser (7:11:2) und ließen die Lösung 30 Minuten am Rückfluß im siedenden Wasserbad hydrolysieren.

Die gleichen Resultate erhielten wir, wenn wir 50 ml Flavonlösung mit 10 ml 5%iger Salzsäure oder Schwefelsäure eine Stunde am Rückfluß im Wasserbade erhitzten.

Für die "quantitative Hydrolyse" wurde Glykosid A bei 110°C im Trockenschrank zunächst bis zur Gewichtskonstanz getrocknet. Ca. 15 mg Substanz lösten wir in 10 ml 3%iger Salzsäure vorsichtig auf dem Heizpilz und hydrolysierten darauf 2 Stunden im siedenden Wasserbad am Rückflußkühler. Nach 24stündigem Unterkühlen im Eisschrank filtrierten wir die ausgefallenen Aglykone in eine konstant getrocknete und gewogene Mikrofilternutsche (G 3), wuschen mit wenig destilliertem Wasser nach, trockneten erneut bei 110°C bis zur Gewichtskonstanz und bestimmten die Gewichtszunahme.

h) Quantitative Zuckerbestimmung nach der Anthronmethode:

Wir erhitzen 2 ml einer wässrigen Lösung von Glykosid B mit 2 ml 2n-Schwefelsäure 2 Stunden am Rückfluß und füllten nach dem Abkühlen mit Methanol p.a. auf 8 ml auf. Die Konzentration des Aglykons wurde spektrophotometrisch bei einer Wellenlänge von 335 mμ und einer Schichtdicke von 1 cm bestimmt. Mit Hilfe der für das Lambert-Beersche Gesetz zutreffenden Formel berechneten wir die Aglykonkonzentration:

$$c = \frac{E}{E_{\text{spez.}} \cdot d}$$

*) "Echtblausalz B" der Firma Serum-Vertrieb, Marburg.

Für eine Aglykonextinktion von 1,030 bzw. 1,078 errechnet sich eine Aglykonkonzentration von 0,061 bzw. 0,0645 g/l.

Weitere 2 ml der wässerigen Stammlösung versetzten wir mit 4 ml einer 0,2%igen Anthronlösung in 96%iger Schwefelsäure. Nach 15 Minuten wurde die Absorption bei einer Wellenlänge von 620 m μ gegen eine Anthronvergléichslösung (= 2 ml destilliertes Wasser + 4 ml 0,2%ige Anthronlösung in 96%iger Schwefelsäure) gemessen. Aus einer für Glucose aufgestellten Eichkurve konnten wir für die bei 620 m μ gemessenen Extinktion die Zuckerkonzentration ablesen. Für eine gemessene Extinktion von 0,31 ergab sich eine Zuckerkonzentration von 60 γ /2 ml bzw. 0,03 g/l. Hieraus ergibt sich das Verhältnis von Aglykon zu Zucker zu 0,49 bzw. 0,51. Die für Monoglykoside berechneten Verhältniszahlen sind 1:0,59, für Diglykoside 1:1,15.

i) Darstellung der Osazone:

Die bis auf ca. 0,5 ml eingeengten Zuckerlösungen versetzten wir in einem Zentrifugengläschen mit dem gleichen Volumen einer frisch bereiteten Phenylhydrazinchloridlösung (= 1 g Phenylhydrazinhydrochlorid + 1,5 g Natriumazetat ad 10 ml destilliertes Wasser). Das Gläschen versahen wir oben mit einem Gummistopfen und 20 cm Steigrohr und hängten es 1 Stunde in das siedende Wasserbad. Nach dem Abkühlen wurde das ausgefallene Osazon abzentrifugiert, mit einigen Tropfen Wasser gewaschen und aus 96%igem Äthanol umkristallisiert.

k) UV-absorptionsspektroskopische Untersuchungen mit Natriumazetat, Borsäure/Natriumazetat, Aluminiumchlorid und Aluminiumchlorid/Natriumazetat:

Wir stellten uns von Glykosid A und B Stammlösungen her, welche die schon früher beschriebene geeignete Konzentration von 10^{-4} mol. hatten.

Ungefähr 5 ml dieser Stammlösung schüttelten wir 3 Minuten mit frisch geschmolzenem, wasserfreien NATRIUMAZETAT, das wir im Überschuß zugesetzt hatten und führten dann sofort nach Filtration die Messungen durch.

Wiederum 2 ml der Standardlösung versetzten wir mit 2 ml einer gesättigten, methanolischen BORSÄURELÖSUNG, schüttelten mit einem Überschuß von frisch geschmolzenem Natriumazetat 3 Minuten lang und bestimmten die Absorption nach Filtrieren und 15 Minuten Stehenlassen der Lösung.

1 ml einer 0,01 mol. ALUMINIUMCHLORIDLÖSUNG (wasserfreies AlCl_3 in Methanol p.a. gelöst) wurde mit 3 ml Standardlösung gemischt, einige Minuten kräftig durchgeschüttelt und sofort die Messung vorgenommen. Nach Aufnahme des Spektrums schüttelten wir diese Lösung wieder mit wasserfreiem, frisch geschmolzenem Natriumazetat 3 Minuten lang und stellten nach 15 Minuten Stehen die Verschiebung der Maxima fest.

1) Azetylierung des Aglykons A:

Wir lösten 10 mg des im Vakuum getrockneten Aglykons in einer Mischung von 4 ml Essigsäureanhydrid und 5 Tropfen reinem Pyridin. Nach Zusatz von 0,5 g wasserfreiem, frisch geschmolzenem Natriumazetat wurde die Lösung auf offener Flamme mit einem Spezial-Mikrobunsenbrenner 3 Stunden erhitzt. Nach dem Abkühlen gossen wir die Lösung in 5 ml kaltes destilliertes Wasser und spülten das Kölbchen mit der gleichen Wassermenge nach und gaben die Lösung in den Eisschrank. Über Nacht hatte sich ein bräunliches Produkt abgeschieden, welches wir auf einer G3-Mikronutsche abfiltrierten und mit destilliertem Wasser bis zur Säurefreiheit auswuschen. Das Azetylprodukt wurde aus 96%igem Äthanol umkristallisiert. Die zunächst erhaltenen Kristalle waren noch nicht schmelzpunktsrein, so daß wir nochmals umkristallisierten und zwar diesmal zuerst aus Benzol/Petroläther und anschließend aus Äthanol/Wasser. Das erhaltene kristalline Produkt hatte einen Schmelzpunkt von 225-227° C.

L e b e n s l a u f

Am 21. Februar 1930 wurde ich, Heinz Schilcher, als Sohn des Kaufmannes Josef Schilcher und seiner Ehefrau Anna, geb. Grünthanner in Burgheim/Schwaben geboren.

Nach dem Besuch der Volksschule in Bittenbrunn bei Neuburg/Donau trat ich im Herbst 1941 in das Gymnasium mit Oberrealschule (Oberschule für Jungen im Abbau) in Neuburg/Donau ein. Im Juni 1950 erhielt ich das Reifezeugnis.

Nach der zweijährigen Praktikantenzeit in der Apotheke der Barmherzigen Brüder in Neuburg/Donau bestand ich im September 1952 das pharmazeutische Vorexamen in Augsburg. Im November 1952 nahm ich in München das Studium der Pharmazie auf und schloß dieses im Mai 1956 mit dem pharmazeutischen Staatsexamen ab. Am 1. Juni 1957 erhielt ich die Bestallung als Apotheker.

Im September 1956 begann ich mit der Anfertigung der vorliegenden Arbeit am Institut für Pharmazeutische Arzneimittellehre der Universität München unter Anleitung von Herrn Professor Dr. L. Hörhammer. Vom 1. Februar 1957 bis 31. Juli 1958 war ich als studentische Hilfskraft eingesetzt. Ab 1. August 1958 bin ich Verwalter einer wissenschaftlichen Assistentenstelle an diesem Institut.

